

**REJEKTIVESILANNOITTEEN MAHDOLLISTEN
KONTAMINAATIOREITTIIEN JA -SYIDEN SELVITTÄMINEN
JA
MIKROBIOLOGISEN PIKAMENETELMÄN SOVELTUVUUS
REJEKTIVESILANNOITTEEN LAADUNHALLINTAAN**



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Hämeenlinna, bio- ja elintarviketekniikka

kevät, 2018

Päivi Keskinen

Bio- ja elintarviketekniikan koulutus
Hämeenlinna

Tekijä	Päivi Keskinen	Vuosi 2018
Työn nimi	Rejektivesilannoitteen mahdollisten kontaminaatioreittien ja -syiden selvittäminen ja mikrobiologisen pikamenetelmän soveltuvuus rejektivesilannoitteen laadunhallintaan	
Työn ohjaaja	Tuija Pirttijärvi	

TIIVISTELMÄ

Tässä opinnäytetyössä selvitettiin rejektivesilannoitteen mahdollisia kontaminaatioreittejä ja -syitä sekä mikrobiologisen pikamenetelmän soveltuvuutta rejektivesilannoitteen laadunhallintaan. Työn toimeksiantaja oli St1 Renewable Energy Oy:n Hämeenlinnan tuotantolaitos, joka tuottaa mm. biokaasuprosessin sivutuotteena syntyvästä mädätejäänöksestä lannoitevalmisteita.

Lannoitevalmisteille on asetettu erilaisia laatuun ja hygieniaan liittyviä säännöksiä, joilla voidaan mm. ehkäistä erilaisten taudinaiheuttajien pääsy ihmisten ja eläinten ravintoon. Maa- ja metsätalousministeriön lannoitevalmisteasetuksen (2011) mukaan lannoitetuotteiden taudinaiheuttajamikrobeja ovat salmonella, *Escherichia coli* ja juuripoltesieni. Opinnäytetyössä selvitettiin rejektivesilannoitteen mahdollisia kontaminaatioreittejä ja -syitä *E. colin* näkökulmasta. Laitokselta kerättiin kesän 2017 aikana erityyppisiä mikrobiologisia näytteitä, joiden avulla saatiin selvitettyä rejektiveden mahdollinen kontaminaatitapa ja -syy. Potentiaalisimmaksi kontaminaatiolähteeksi osoittautui rejektivesikuormia hakevat autot, joista löytyi *E. colia*. Myös kesän aikaiset olosuhteet lisäävät kontaminaatoriskejä.

Opinnäytetyössä selvitettiin myös EnSURE-luminometrin ja MicroSnap *E. coli* -testin soveltuvuutta rejektiveden mikrobiologiseen laadunhallintaan. Asian selvittämiseksi suoritettiin kolme koetta, joiden tulosten perusteella voitiin todeta, että menetelmä ei sovellu rejektiveden mikrobiologisen laadun testaamiseen. Rejektiveden sameus tai sen kemiallinen tai entsyymaattinen laatu voi haitata menetelmän toimivuutta.

Avainsanat *Escherichia coli*, laadunvalvonta, lannoite, luminometri, rejektivesi

Sivut 57 sivua, joista liitteitä 3 sivua

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering
Hämeenlinna

Author	Päivi Keskinen	Year 2018
Subject	Retracing Possible Contamination Paths and Causes of the Reject Water Fertilizer and the Suitability of Rapid Microbiological Test Method for the Quality Control of the Reject Water Fertilizer	
Supervisor	Tuija Pirttijärvi	

ABSTRACT

The purpose of this Bachelor's thesis was to retrace the possible contamination paths and causes of the reject water fertilizer and to examine the suitability of rapid microbiological test method, EnSURE luminometer and MicroSnap *E. coli* test, for the quality control of the reject water fertilizer. In this thesis the reject water fertilizer means the fertilizer concentrate from the liquid fraction of digestate. The thesis was commissioned by St1 Renewable Energy Ltd production plant in Hämeenlinna. The plant produces i.a. fertilizer products from the digestate of the biogas production process.

Fertilizers have many regulations which e.g. help to prevent disease-causing microbes to end up in food or feed. One disease-causing microbe or pathogen in fertilizers is *Escherichia coli*. Many microbiological samples from the plant were gathered and analyzed in summer 2017 to figure out the possible contamination ways and causes of the reject water fertilizer. The most potential origin of the contamination were the trucks which transport the product to customers. *E. coli* was found in two trucks during the summer. Furthermore, the conditions in summertime increase the risk of contaminations.

The suitability of the EnSURE luminometer and MicroSnap *E. coli* test was tested three times for the reject water fertilizer. In conclusion, the method is not suitable for the microbiological quality control of the product. The opacity or the chemical or enzymatic quality of the reject water fertilizer may be the main causes why the method is unsuitable.

Keywords *Escherichia coli*, quality control, fertilizer, luminometer, fertilizer from the liquid fraction of digestate (reject water fertilizer)

Pages 57 pages including appendices 3 pages

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	BIOKAASUN TUOTANTOPROSESSIN SYÖTTEET JA POISTEET	2
2.1	Biokaasuprosessin syötteet.....	2
2.2	Biokaasuprosessissa syntyvä poiste	3
3	LANNOITEVALMISTEIDEN TUOTANNON OMAVALVONTA.....	4
4	LANNOITEVALMISTEIDEN LAATUKRITEERIT	5
4.1	Tuotteiden laatukriteerit.....	6
4.2	Tuotteiden mikrobiologiset laatukriteerit.....	6
4.2.1	Salmonella	7
4.2.2	<i>Escherichia coli</i>	7
4.2.3	Juuripoltesieni	8
5	<i>ESCHERICHIA COLI</i> KASVU- JA SÄILYMISOLOSUhteet.....	8
6	MIKROBIOLOGISIA PIKAMÄÄRITYSMENETELMIÄ <i>E. COLI</i> LLE	10
6.1	Colilert	10
6.2	3M Petrifilm <i>E. coli</i> / Coliform Count Plate ja Select <i>E. coli</i> Count Plate	11
6.3	Compact Dry EC.....	12
6.4	EnSURE ja MicroSnap <i>E. coli</i>	12
7	KÄYTETYT MENETELMÄT JA ESIVALMISTELUT	14
7.1	Mikrobianalyysit	14
7.2	Rejektivesilannoitteen pH:n säätö ja suodattavuus	16
8	TYÖN TOTEUTUS – KONTAMINAATIOREITTIIEN JA -SYIDEN SELVITTÄMINEN.....	17
8.1	Näytteenottosuunnitelma.....	18
8.2	Näytteenotot.....	19
8.2.1	Pintasivelynäytteet	19
8.2.2	Nestenäytteet	20
8.2.3	Ilmanäytteet	21
8.3	Viikkonäytteet ja muut näytteet	22
9	TYÖN TOTEUTUS – ENSURE-LUMINOMETRIN JA MICROSNAP <i>E. COLI</i> -TESTIN SOVELTUVUUS REJEKTIVEDELLE.....	23
9.1	Ensimmäinen koe	25
9.2	Toinen koe.....	25
9.3	Kolmas koe	27
10	TULOKSET – KONTAMINAATIOREITTIIEN JA -SYIDEN SELVITTÄMINEN	27
10.1	Pintasivelynäytteiden tulokset.....	28
10.2	Nestenäytteiden tulokset.....	34

10.3 Ilmanäytteiden tulokset	35
10.4 Viikkonäytteiden ja muiden näytteiden tulokset.....	37
11 TULOKSET – ENSURE-LUMINOMETRIN JA MICROSNAP <i>E. COLI</i> -TESTIN SOVELTUVUUS REJEKTIVEDELLE	38
11.1 Toinen koe.....	39
11.2 Kolmas koe	42
12 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	44
12.1 Rejektiveden kontaminaatioreitit ja -syyt.....	44
12.2 EnSURE-luminometrin ja MicroSnap <i>E. coli</i> -testin soveltuvuus rejektivedelle	46
LÄHTEET	49

Liitteet

Liite 1	1. kokeen tulokset luminometrille
Liite 2	Huomioitavia asioita näytteenotossa
Liite 3	Näytteenottosuunnitelma rejektiveden ollessa kontaminoitunut

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin St1 Renewable Energy Oy:n Hämeenlinnan tuotantolaitoksen toimeksiannosta. Tuotantolaitos valmistaa biojätteistä bioetanolia. Bioetanolin valmistuksessa syntyy sivuvirtana biomassaa, joka johdetaan biokaasutukseen. Biokaasuprosessista syntyy sivuvirtana mädätejäänöstä, joka separoidaan kuiva- ja nestejakeeksi. Saatuja jakeita jatkojalostetaan erilaisiksi lannoitetuotteiksi. Saatu nestejake jatkojalostetaan rejektivedeksi, joka on eräs orgaanisten lannoitteiden tyyppinimi. Lannoitetuotteille on asetettu erilaisia laatuun ja hygieniaan liittyviä säännöksiä, joilla voidaan mm. ehkäistä erilaisten taudinaiheuttajien pääsy ihmisten ja eläinten ravintoon. Maa- ja metsätalousministeriön lannoitevalmisteasetuksen (2011) mukaan lannoitetuotteiden taudinaiheuttajamikrobeja ovat salmonella, *Escherichia coli* ja juuripoltesieni.

Opinnäytetyössä selvitettiin rejektiveden mahdollisia kontaminaatioreittejä ja -syitä St1:n Hämeenlinnan tuotantolaitoksella. Tähän liittyviä tutkimuskysymyksiä olivat:

- Onko rejektivesivarastosäiliöiden ympäristössä havaittavissa mikrobipitoisuuksien nousua kesäkuukausien aikana?
- Mistä rejektiveden mahdollinen kontaminoituminen voi johtua? Mistä mahdolliset taudinaiheuttajamikrobit kulkeutuvat rejektiveen?

Rejektivesi käy läpi prosessoinnin aikana hygienisoinnin, joka tuhoaa kaikki taudinaiheuttajamikrobit. Onnistuneesta hygienisoinnista huolimatta on silti mahdollista, että rejektivesi voi kontaminoitua varastoinnin aikana erilaisista syistä ennen päätymistä asiakkaalle. Tutkittavaksi taudinaiheuttaja- eli indikaattorimikrobiksi valittiin *E. coli*. Laitokselta kerättiin kesän 2017 aikana erilaisia neste-, ilma- ja pintasivelnäytteitä, joista analysoitiin kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti erilaisia mikrobeja ja mikrobipitoisuuksia. Tulosten perusteella voitiin arvioida ja kartoittaa rejektiveden mahdollisia kontaminaatioreittejä ja -syitä. Tulosten perusteella laitoksella voitiin tehdä tarvittavia muutoksia rejektiveden hygieenisen laadun takaamiseksi myös jatkossa.

Opinnäytetyössä selvitettiin myös Hygienan EnSURE-luminometrin ja MicroSnap *E. coli* -testin soveltuvuutta rejektiveden mikrobiologiseen laadunhallintaan. Tähän liittyvä tutkimuskysymys oli:

- Soveltuuko Hygienan EnSURE-luminometri ja MicroSnap *E. coli* -testi rejektiveden mikrobiologisen laadun testaamiseen? Jos ei sovellu, mikä siihen voi olla syynä?

Ennen työn toimeksiantoa ja työn toteutuksen aikana laitoksella käytössä ollut testausmenetelmä ei ollut toivotun nopea laitoksen tarpeisiin. Työn tilaajan toivomuksena oli saada helppokäyttöinen menetelmä, jolla rejektiveden mikrobiologinen laatu voitaisiin selvittää yhden työvuoron aikana. EnSURE-luminometrilla ja MicroSnap *E. coli* -testillä tulokset valmistuvat 6–8 tunnissa. Menetelmä on kehitetty elintarvike- ja juomateollisuuden tarpeisiin ja sillä voidaan testata myös prosessilaitteiden puhtautta pintanäytteillä. Tästä syystä menetelmän soveltuvuudesta rejektivedelle heräsi työn alussa kysymyksiä: onnistuuko rejektiveden pH:n säätö testin vaatimaan arvoon ja onko rejektiveden sameudella vaikutusta tulosten luotettavuuteen? Menetelmälle suoritettiin kesän ja syksyn 2017 aikana yhteensä kolme testiä tai koetta, joiden tulosten perusteella menetelmän soveltuvuus rejektivedelle voitiin selvittää.

Opinnäytetyön alkuun (luvut 2–6) on etsitty kirjallisuudesta tietoa biokaasuprosessin sivuvirroista, lannoitevalmisteiden tuotannon omavalvonnasta, lannoitevalmisteiden laatuksikriteereistä, *Escherichia colista* ja mikrobiologisista pikamenetelmistä *E. coli* testaamiseen.

2 BIOKAASUN TUOTANTOPROSESSIN SYÖTTEET JA POISTEET

Biokaasuprosessi on anaerobinen mädätysprosessi, jossa erilaiset mikro-organismit hajottavat prosessin syötteiden orgaanista ainesta. Biokaasuprosessi koostuu neljästä päävaiheesta: hydrolyysistä, fermentaatiosta, asetogeneesistä ja metanogeneesistä. Viimeisessä vaiheessa eli metanogeneesissä metanogeenimikrobit tuottavat biokaasua eli metaania ja hiilidioksidia. (Kymäläinen 2015, 60–62.)

Prosessista jää jäljelle poiste eli mädätysjäännös tai mädätejäännös, jota kutsutaan myös käsittelyjäännökseksi. Tämä jäännös sisältää runsaasti ravinteita, joten sitä joko käytetään sellaisenaan lannoitteena ja maanparannusaineena tai sitä jatkojalostetaan erilaisiksi lannoitetuotteiksi. (Kinnunen & Rintala 2015, 9–10, 18.)

2.1 Biokaasuprosessin syötteet

Biokaasuprosessin syötteinä eli orgaanisen aineksen lähteinä käytetään yleensä helposti hajoavia eloperäisiä materiaaleja. Syötteinä voi toimia esimerkiksi teollisuuden tai yhdyskuntien jätevesilietteet, kasviperäiset jätteet ja biomassat sekä eläinperäiset sivutuotteet kuten ruokajäte ja lanta. (Latvala 2009, 22.)

Syötemateriaalit tulee käsitellä ennen kuin ne voidaan syöttää prosessiin. Käsittelyssä syötteistä poistetaan epäpuhtaudet, ne murskataan tarvittavan hienoksi ja sekoitetaan tasalaatuiseksi. Saadun massan kuiva-

ainepitoisuus ja orgaanisten aineiden pitoisuus eli orgaaninen kuorma tulee säätää sopivaksi, jotta biokaasuprosessi toimii halutulla tavalla. Syötemateriaaleista riippuen syötemassalle tulee myös suorittaa tarvittaessa hygienisointi tai sterilointi haitallisten tai vaarallisten mikrobien tuhoamiseksi. Jos syöte koostuu useammasta eri materiaalista, sille tehdään vaativimman materiaalin mukainen käsittely. Maatilatason biokaasuprosesseissa syötteille ei välttämättä tarvitse suorittaa esikäsittelyitä, kun tunnetaan lannan ja viherbiomassojen ominaisuudet ennalta. Näistä syötteistä saatavia lopputuotteita ei voi kuitenkaan kutsua lannoitteiksi ja niihin sovelletaan raakalannalle annettuja käyttösuosituksia ja sopimusmenettelyjä. Syötteinä olevia puhdistamoliettteitä ei tarvitse hygienisoida, jos niistä saatava käsittelyjäännös jatkojalostetaan jollakin toisella laitoksella. (Latvala 2009, 23–24.)

Eläinperäisiä sivutuotteita käsitellessä on noudatettava muiden kuin ihmisravinnoksi tarkoitettujen, eläimistä saatavien sivutuotteiden terveystännöistä annettua Euroopan parlamentin ja neuvoston sivutuoteasetusta. Syötteet tulee hygienisoida aina, jos käsiteltävänä on luokan 3 eläinperäisiä sivutuotteita. Luokka 3 sisältää mm. ruokajätteitä sekä elintarviketeollisuuden sivutuotteita. Hygienisointi tapahtuu 70 asteessa vähintään tunnin ajan, kun syötteen partikkelikoko on maksimissaan 12 millimetriä. Hygienisointi voidaan tehdä ennen tai jälkeen biokaasuprosessin. Sterilointi vaatii 133 asteen lämmön vähintään 20 minuuttia 3 barin paineessa. (Latvala 2009, 38.)

Syötteisiin voi esikäsittelystä huolimatta jäädä epäpuhtauksia kuten muoveja ja metallia ja näiden lisäksi syötteet voivat sisältää haitallisia yhdisteitä, joita ovat mm. orgaaniset haitta-aineet, lääkeaineet ja hormonijäämät. Nämäkin komponentit haitallisten mikrobien lisäksi on pystyttävä poistamaan biokaasuprosessin aikana tai sen jälkeen, jotta mädätejäännöksen hyödynnettävyys lannoitevalmisteiksi pysyisi edelleen toivotulla tasolla. (Paavola & Kapuinen 2015, 95–96.)

2.2 Biokaasuprosessissa syntyvä poiste

Poiste eli mädätejäännös tai käsittelyjäännös on erittäin ravinnepitoista ja se sopii orgaanisen alkuperänsä ansiosta hyvin lannoitetuotteeksi ja se on lannoitteena jopa nopeampitehoisempaa kuin alkuperäinen syötemateriaali, koska ravinteet ovat mädätejäännöksessä kasveille edullisemmassa muodossa. Orgaaninen lannoite lisää maaperän biologista aktiivisuutta ja auttaa hyvän maarakenteen saavuttamista pelloilla mm. veden ja ravinteiden sitomiskyvyn ansiosta. (Kari & Häkkinen n.d., 14.)

Mädätejäännös on tyypillisesti hyvin märkää ja tasakoosteista ainesta, joka voidaan etenkin maatilatasolla levittää sellaisenaan pellolle lannoitteeksi, jos syötemateriaalina on käytetty tilalla syntyviä kasvi- ja eläinperäisiä jakeita. Kuitenkin käsittelemättömän mädätejäännöksen sisältämä tyyppi voi haihtua herkästi ilmaan, jolloin kasveille jää vähemmän tyypeä

hyödynnettäväksi. Määdätejäännöstä kannattaa siis jollakin tavalla käsitellä ravinteiden säilyvyyden parantamiseksi. (Kari & Häkkinen n.d., 14; Latvala 2009, 50–51.)

Varsinkin laitokseen kasvaessa määdätejäännöksen jatkokäsittely on yleensä tarpeellista. Määdätejäännöksen ensimmäinen käsittely on yleensä sen erottelu neste- ja kuivajakeeksi. Erotusmenetelmiä on olemassa useita, joita ovat mm. erilaiset lingot, seulat, ruuvikuivaimet, kuivaus ja haihdutus. Erottelusta saatava nestejake sisältää yleensä suurimman osan määdätejäännöksen tyyppistä ja kuivajake suurimman osan fosforista. Nämä ovat kasvien viljelyn kannalta tärkeimmät ravinteet. (Paavola & Kapuinen 2015, 99; Motiva Oy 2013, 13.)

Eroteltua nestejaetta, jota kutsutaan myös rejektivedeksi, voidaan käyttää sellaisenaan lannoitteena mutta on yleistä, että sille tehdään vielä jatkokäsittelyjä. Jatkokäsittelytekniikoita on useita, mm. strippaus, haihdutus ja kalvosuodatus. (Paavola & Kapuinen 2015, 102.) Nestejakeen käsittelytekniikoilla tavoitellaan yleensä sen sisältämän ammoniumtyypen talteenottoa erilaisiksi typpiliuoksiksi esimerkiksi ammoniumsulfaatiksi, tai nestejakeen konsentroimista, jolloin sen kuljettamisesta tulee kannattavampaa (Paavola & Kapuinen 2015, 104; Luostarinen 2013, 20).

Kuivajaeetta voidaan käyttää sellaisenaan mutta sitä voidaan myös jälkistabiloida lisäämällä sekaan mm. turvetta ja hiekkaa. Jälkistabilointi muuttaa jakeen käsiteltävyyttä ja vähentää mahdollisia hajuhaittoja. Kuivajakeelle on myös mahdollista tehdä lämpökäsittely, jossa sitä kuivataan ja kuivauksen yhteydessä massasta voidaan valmistaa esimerkiksi pellettejä. (Paavola & Kapuinen 2015, 110–111.)

3 LANNOITEVALMISTEIDEN TUOTANNON OMAVALVONTA

Lannoitevalmisteita tuottavan yrityksen on tunnettava kriittiset valmistus- ja käsittelyvaiheet, jotka liittyvät lannoitevalmisteiden laatuun. Vaiheista ei saa aiheutua vaaraa ihmisten tai eläinten turvallisuudelle eikä ihmisten, eläinten ja kasvien terveydelle eikä ympäristölle. Valmistuksen ja käsittelyn kriittisiä vaiheita tulee valvoa säännöllisesti, omavalvontavelvoitteisesti. Evira on velvollinen auttamaan omavalvontasuunnitelman laatimisessa ja toteuttamisessa. (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 13.)

Omavalvontasuunnitelma on kirjallinen suunnitelma, joka toimitetaan Eviralle ja suunnitelmaa on toteutettava käytännössä. Suunnitelmaan tulee selvittää toimintaan liittyvät työvaiheet, työvälineet, koneet, laitteet, lopputuotteet ja niiden valvonta. Toiminnan kriittiset vaiheet ja menetelmät vaiheiden valvomiseksi tulee määritellä. Kriittisille vaiheille määritellään toimenpiderajat ja menettelyt, joihin ryhdytään toimenpiderajojen mahdollisesti ylittyessä. Myös suunnitelma toimenpiteistä lannoitteen laadun

ollessa puutteellista tulee kuvata. Noudattaessa omavalvontasuunnitelmaa, toiminnanharjoittaja pystyy ennaltaehkäisemään puutteellisen laadun tuotteen pääsyn käyttöön. (Evira 2012.)

Evira antaa omavalvontasuunnitelman laadintaohjeissa (2012) kuvauksen suunnitelman sisällöstä. Suunnitelmasta tulee löytyä seuraavat asiat:

- toiminnasta vastuussa olevat henkilöt ja henkilökunnan perehdyttäminen
- raaka-aineiden vastaanotto
- maahantuonti ja sisämarkkinointi
- eräkohtainen jäljitettävyyden
- tuotanto- ja toimintaprosessit
- häiriötilanteet
- laadunvalvonta- ja näytteenottosuunnitelma
- laatu poikkeamat
- varastointi, säilytys ja kuljetus
- tuotekehitys- ja koetoiminta.

Toiminnanharjoittajan on toimitettava vuosittain Eviralle omavalvontaraportti, josta ilmenee kriittisten valmistus- sekä käsittelyvaiheiden valvonnan tulokset, omavalvonnassa havaitut ongelmat ja puutteet ja kuinka niihin on reagoiduttu. (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 15.)

Omavalvontaan liittyvien analyysien virallisena laboratoriona toimii Evira. Jos toiminnanharjoittaja haluaa käyttää analyysien teettämiseen jotakin muuta laboratoriota, tulee sen olla Eviran hyväksymä. Tällainen laboratorio on pätevä tekemään analyyskejä EY:n lainsäädännön mukaan tai vähintäänkin kansainvälisesti hyväksytyillä standardimenetelmillä. Myös yhtä pätevät validoidut lannoitevalmisteiden analysointiin ja näytteenottoon liittyvät menetelmät ovat hyväksyttäviä. (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 19.)

4 LANNOITEVALMISTEIDEN LAATUKRITEERIT

Lannoitevalmisteiden tulee täyttää lannoitevalmistelaissa sekä sen nojalla annetuissa säädöksissä asetetut vaatimukset. Yksi näistä säädöksistä on maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista. Asetuksessa on annettu tarkemmin säännöksiä lannoitevalmisteiden tyypeistä ja niiden vaatimuksista, tyyppinimiyhmistä sekä valmisteiden laatu-, merkintä-, pakkaus-, kuljetus-, varastointi-, käyttö- ja muista vaatimuksista. Asetuksen liitteessä IV on annettu rajoitukset lannoitevalmisteiden haitallisille aineille, eliöille ja epäpuhtauksille. (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 5; Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 24/11.)

Lannoitevalmisteisiin luetaan lannoitteet, kalkitusaineet, maanparannusaineet, kasvualustat ja mikrobivalmisteet. Kaikki edellä luetellut ovat lannoitevalmistetyyppinimiryhmiä. Esimerkiksi biokaasuprosessista saatava mädätejäännös ja siitä separoitu kuivarakeeksi jalostettu kuivajae luokitellaan maanparannusaineeksi. Mädätejäännöksestä separoitu nestejaje taas luokitellaan lannoitteeksi. (Maa- ja metsätalousministeriö n.d; Marttinen, Paavola, Ervasti, Salo, Kapuinen, Rintala, Vikman, Kapanen, Torniainen, Maunuksela, Suominen, Sahlström & Herranen 2013, 11.) Kaikki kotimaassa markkinoille tuotetut sekä ulkomailta tuodut lannoitevalmisteet tulee kuulua kansalliseen lannoitevalmisteiden tyyppinimiluetteloon tai EY-lannoitteiden osalta lannoitetyyppien luetteloon (Maa- ja metsätalousministeriö n.d.).

4.1 Tuotteiden laatukriteerit

Lannoitteiden pääravinteita ovat typpi, fosfori ja kalium. Lannoitteissa tulee olla myös tietty määrä sivu- ja hivenravinteita (kalsium, magnesium, natrium, rikki), joiden pitoisuus tulee ilmoittaa tuotteessa. Lannoitevalmistasetuksessa on ilmoitettu lisäksi muitakin ravinteita, joiden vähimmäispitoisuus voidaan ilmoittaa tuotetyypistä riippuen. Epäorgaanisiin lannoitteisiin voidaan lisätä sallittuja orgaanisia aineita sekä kelaatteja ja kompleksin muodostajia. Kaikille lannoitevalmisteille on lueteltu erilaisia ravinteisiin ja muihin ominaisuuksiin liittyviä poikkeamia, jotka sallitaan tuotteessa. (Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 24/11.)

Sallittujen tai vähimmäisravinnepitoisuuksien lisäksi asetuksessa on annettu enimmäispitoisuuksia haitallisille aineille, eliöille ja epäpuhtauksille. Haitallisia aineita ovat erilaiset alkuainemetallit. Haitallisia eliöitä ovat taudinaiheuttajat (ks. luku 4.2) ja kasvintuhoojat. Kasvintuhoojia ei saa esiintyä ollenkaan kasviperäisistä raaka-aineista tai multajakeista valmistetuissa lannoitevalmisteissa. Kasvintuhoojien leviämiseksi ja ennaltaehkäisemiseksi on annettu asetuksessa erilaisia ohjeita. Lannoitevalmisteiden epäpuhtauksiksi on lueteltu enimmäispitoisuuksina erilaiset rikkakasvin siemenet, roskat (mm. lasi, metalli ja muovi), hukkakaura sekä kasvin osat. (Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 24/11.)

4.2 Tuotteiden mikrobiologiset laatukriteerit

Maa- ja metsätalousministeriön lannoitevalmistasetuksessa (2011) on ilmoitettu kolme taudinaiheuttajaa ja indikaattorieliötä, joille on annettu enimmäispitoisuusrajat lannoitetuotteissa. Taudinaiheuttajat ovat salmonella, *Escherichia coli* ja juuripoltesieni. Salmonellaa ei saa esiintyä ollenkaan 25 grammassa näytettä, *E. coli*a saa olla korkeintaan 1 000 pmy/g ja ammattimaiseen kasvihuoneviljelyyn tarkoitetuissa kasvualustoissa korkeintaan 100 pmy/g. Juuripoltesientä ei saa esiintyä ollenkaan

taimituotannossa käytettävissä kasvualustoissa. (Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 24/11.)

4.2.1 Salmonella

Salmonella on suolistobakteeri, joka voi lisääntyä hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa ja se voi säilyä hengissä suoliston ulkopuolella. Se on myös zoonoosi eli se voi levitä eläimistä ihmisiin ja päinvastoin. Tuotantoeläimet voivat saada tartunnan saastuneesta rehusta tai juomavedestä. Myös ihmisiin salmonella voi tarttua ruoan ja veden välityksellä. Suomessa on tehokas salmonellavalvontaohjelma ja Suomessa esiintyykin Ruotsin ja Norjan lisäksi hyvin vähän salmonellatartuntoja. (Evira 2016a.) Salmonella saastuneet lannoitteet on käsiteltävä uudelleen siten, että salmonella tuhoutuu. Käsittelemätön saastunut erä voidaan käyttää esimerkiksi suljetulla teollisuusalueella tai kaatopaikan maisemoinnissa siten, että käytöstä ei aiheudu salmonellan leviämisvaaraa. (Evira 2017.)

4.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli tavataan normaalisti ihmisten ja eläinten suolistossa ja se on hyödyllinen suoliston bakteeri, joka osallistuu mm. haitallisten bakteerien kasvun ehkäisyyn suolistossa. Jotkin *E. coli* -kannat ovat kuitenkin muuntuneet ominaisuuksiltaan siten, että ne voivat sairastuttaa eläimen tai ihmisen. Yksi tällainen muuntunut *E. coli* on EHEC-bakteeri eli enterohemorraaginen *E. coli*. Tämä on shigatoksiineja tuottava bakteeri (STEC). (Evira 2016b; WHO 2017; Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2015.)

Nautakarja ja muut märehitjät voivat olla bakteerin oireettomia kantajia. Nautaeläinten suoliston voidaankin katsoa olevan EHEC-bakteerin luonnollinen varasto ja lähde. Jos bakteeria esiintyy esimerkiksi elintarvikkeissa, on se aina merkki ulosteperäisestä saastumisesta. Elintarvikkeet voivat saastua jo aikaisessa vaiheessa, jos esimerkiksi lypsettävä maito tai teurastettava liha kontaminoituu huonon hygienian vuoksi. Likaantuneet kasteluviedet voivat saastuttaa esimerkiksi vihanneksia. Tartunnan saanut ihminen voi levittää bakteeria eteenpäin, jos tehokkaasta käsihygieniasta ei huolehdita. Tartunnan voi saada myös saastuneen uimaveden välityksellä. (Evira 2016b.) EHEC-bakteeri tuhoutuu yli 70 asteessa (Hallanvuo & Johansson 2010, 49).

EHECin tarttumiseen vaaditaan vain pieni määrä bakteereja, 10–100 kappaletta, ja sen itämisaika on yleensä 3–4 päivää. Tartunnan saanut saa yleensä voimakkaita vatsan kouristuksia ja veriripulin. Joillekin voi kehittyä sairauden jälkeen vakava munuaisten häiriö, tajunnanhäiriöitä tai anemia. Erityisiä riskiryhmiä EHECille ovat etenkin lapset ja vanhukset. (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2015; Jalava, Kuusi, Siitonen & Ruutu 2007, 3–4.)

4.2.3 Juuripoltesieni

Juuripoltesieniin kuuluu mm. *Fusarium* eli punahome. Sitä tavataan yleensä viljoissa ja maississa. Punahomeet tuottavat aineenvaihduntatuotteina homemyrkyjä. Pitkäaikainen altistuminen näille toksiineille voi aiheuttaa terveydelle haittoja kuten elimistön puolustusmekanismien heikkenemistä. (Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 24/11; Evira 2016c.)

5 *ESCHERICHIA COLI* KASVU- JA SÄILYMISOLOSUHTEET

Escherichia coli eli *E. coli* tai kolibakteeri kuuluu lämpökestoisiin koliformisiin bakteereihin. Koliformiset bakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobisia ja gramnegatiivisia sauvabakteereja, joita voidaan kutsua myös kolimuotoisiksi bakteereiksi. (Tässä opinnäytetyössä on käytetty nimitystä koliformit.) Koliformisia bakteereja on olemassa montaa eri tyyppiä, joista tunnetuimpia ovat *Escherichia*-, *Enterobacter*- ja *Klebsiella*-sukujen lajit. (Valvira 2016, 8.)

E. coli havaitseminen kertoo aina suolisto- tai ulosteperäisestä saastumisesta ja se on yksi parhaista käytettävissä olevista indikaattorimikrobeista suolistoperäiselle saastumiselle. *E. coli* ei lisäännä ainakaan merkittävästi suoliston ulkopuolella. (Valvira 2016, 6.) Kuitenkin van Elsas ym. (2010, 176) toteavat raportissaan *E. coli* selviytymisestä ympäristössä *E. coli* pystyvän lisääntymään avoimissa ympäristöissä, riippuen tosin lajista ja ympäristön olosuhteiden vakaudesta. Muut koliformiset bakteerit taas pystyvät lisääntymään esimerkiksi maaperässä ja jätevesissä (Valvira 2016, 6).

Toisin kuin *E. coli*, muut koliformiset bakteerit voivat olla peräisin muualtakin kuin ihmisen tai eläimen suolistosta, kuten maaperästä, kasveista tai teollisuusjätevesistä. Esimerkiksi vesianalytiikassa koliformisten bakteerien havaitseminen vesinäytteestä ei siis aina välttämättä ole merkki ulosteperäisestä saastumisesta. Koliformiset bakteerit toimivat kuitenkin hyvänä indikaattorina talousveden yleiselle saastumiselle ja löydettyäessä niitä talousvedestä, välittömänä toimenpiteenä aletaan selvittää kontaminaation syytä ja vesiverkostoa aletaan käsitellä esimerkiksi huuhteluilla ja desinfioinneilla. (Valvira 2016, 8–9.)

Ihssen ym. (2007, 2053) kertovat Savageaun raportin (1983) mukaan, että *E. coli* -bakteerin elämä on kaksivaiheista: isännästä riippuvaista ja isännästä riippumatonta. Kun *E. coli* päätyy ihmisen tai eläimen ruoansulatuselimistöön, se joutuu hetkellisesti suuren stressin alaiseksi vatsalaukun alhaisen pH:n vuoksi (Ihssen, Grasselli, Bassin, Francois, Piffaretti, Köster, Schrenzel & Egli 2007, 2062). Mutta se kestää hyvinkin happamia olosuhteita, esimerkiksi EHEC-bakteerille on ilmoitettu ainakin pH-arvot 2,5 (van

Elsas, Semenov, Costa & Trevors 2010, 174) ja 3,6 (Albrecht n.d.), joista se voi selviytyä. Kun *E. coli* on selviytynyt vatsalaukusta suolistoon, sillä on erinomaiset olosuhteet kasvulle ja lisääntymiselle (van Elsas ym. 2010, 175). Ulosteperäisten koliformisten bakteerien lisääntymisnopeus on yleisesti ottaen korkea, jos olosuhteet ovat hyvät (Oram 2014). Suoliston ulkopuolella *E. coli* pystyy elämään haasteellisissa olosuhteissa. Evoluutio on muovannut *E. colia* selviytymään laajalti erityyppisillä ravintoaineilla avoimissa ympäristöissä. (Ihssen ym. 2007, 2062; ks. myös van Elsas ym. 2010, 175.) Esimerkiksi EHEC-bakteeri voi säilyä jopa useita viikkoja erilaisissa elintarvikkeissa ja se kestää myös pitkiä aikoja kylmissä vesissä (Hallanvuo & Johansson 2010, 49).

Jotkin *E. coli* -lajit pystyvät luomaan siimamaisia rakenteita, joilla ne pystyvät tarttumaan esimerkiksi viljelykasvien pinnoille saastuneen lannoitteen, veden tai jopa *E. colin* kantajana toimivan kärpäsän (Talley, Wayadande, Wasala, Gerry, Fletcher, DeSilva & Gilliland 2009, 1551) välityksellä. *E. coli* pystyy jopa löytämään tiensä kasvin rakenteen sisäosiin esimerkiksi kasvin juurien kautta (Solomon, Yaron & Matthews 2002, 400), jolloin *E. colin* kulkeutumista ihmisen tai eläimen ravintoon on vielä vaikeampi ehkäistä kasvin huuhteluista ja pesuista huolimatta. Tällöin on vaarana, että harmittomien *E. coli* -bakteerien lisäksi patogeenisiä *E. coli* -bakteereja (esim. EHEC) leviää saastuneesta kasvista muihin tuotteisiin esimerkiksi elintarvikkeiden tuotantolaitoksilla. (van Elsas ym. 2010, 176.)

EHEC-bakteeri on mikrobiologisilta ominaisuuksiltaan samankaltainen kuin tavallinen *E. coli*. Mahdollinen tartunta tapahtuu suoraan esimerkiksi saastuneen elintarvikkeen, käsien tai sairastuneen ihmisen tai eläimen ulosteen välityksellä. (Jalava ym. 2007, 3–7.) Myös saastuneesta uimavedestä voi saada tartunnan. Esimerkiksi Suomen ensimmäinen raportoitu EHEC-epidemia vuonna 1997 sairastutti 18 ihmistä ja syyksi voitiin osoittaa saastunut uimavesi. (Hallanvuo & Johansson 2010, 52.) Voi olla kuitenkin mahdollista, että sairastuminen tapahtuisi myös ilman välityksellä. USA:ssa on raportoitu tapauksia, joissa ihmisiä on saanut *E. coli* -tartunnan maatalousmessujen tyyppisissä tapahtumissa. Sairastumisien syyksi on epäilty pölyisiä eläinnäyttelytiloja, jolloin on todennäköistä, että kuivuneesta eläinten ulosteesta on levinnyt *E. colia* pölyn mukana tarjolla olleen ruoan joukkoon tai suoraan ihmisten suuhun. (Christie 2002.)

E. colin selviytymistä aerosolissa on tutkittu jonkin verran ja yleisesti ottaen *E. coli* kestää paremmin matalampia lämpötiloja ja korkeita kosteuspitoisuuksia mutta esimerkiksi typpikaasussa *E. coli* selviää ehkä paremmin päinvastaisissa olosuhteissa (Wathes, Howard & Webster 1986, 489). Wathes ym. (1986, 489) toteavat tutkimuksessaan, että *E. colin* kuoleminen oli varsin nopeaa alle 50 % suhteellisissa kosteuksissa – 30 asteessa (puoliintumisaika 3 minuuttia) nopeampaa kuin 15 asteessa (puoliintumisaika 14 minuuttia). Korkeassa kosteuspitoisuudessa ja 30 asteessa puoliintumisaika oli 14 minuuttia ja 15 asteessa 83 minuuttia.

6 MIKROBIOLOGISIA PIKAMÄÄRITYSMENETELMIÄ *E. COLILLE*

Mikrobiologiset määrittämenetelmät voidaan jakaa karkeasti perinteisiin menetelmiin ja pikamenetelmiin. Perinteisellä menetelmällä tarkoitetaan yleensä maljaviljelyä, joka on aikaa vievää. Erilaisissa tuotantotiloissa myös aistinvarainen puhtaustarkkailu voidaan lukea kuuluvaksi perinteisen menetelmän tueksi. Pikamenetelmät ovat nimestään huolimatta käyttökelpoisia vaihtoehtoja käytössä oleville referenssimenetelmille, joskin ne tilanteesta riippuen eivät välttämättä voi täysin korvata perinteisiä menetelmiä. Mikrobiologiset pikamenetelmät voivat perustua esimerkiksi impedanssiin, värin muodostukseen, luminesenssiin, spesifisten vasta-aineiden määrittämiseen tai DNA-tekniikkaan. (Nurmela 2006; Johansson 2007.)

Luvuissa 6.1–6.4 on esitelty neljä mikrobiologista pikamäärittämenetelmää *E. coli*n testaamiseen.

6.1 Colilert

Colilert-menetelmä soveltuu talousveden sekä lähde- ja jätevesien testaamiseen ja se perustuu kromogeeniseen ja fluorogeeniseen reaktioon. Analysoitavaan näytteeseen lisätään reagenssi ja saatu seos kaadetaan eräänlaiseen pussiin tai liuskaan (Kuva 1), jossa on kammioita. Jos näytteessä on koliformeja, kammioita muuttuu keltaiseksi (kromogeeninen reaktio) ja jos näytteessä on *E. coli*a, keltaisen värin lisäksi kammiossa voidaan havaita fluoresenssia (fluorogeeninen reaktio). Fluoresenssi voidaan havaita parhaiten 6 watin ja 365 nanometrin UV-valolla pimeässä huoneessa. (Pitkänen, Kalso, Vepsäläinen, Rapala & Niemelä 2009, 12; IDEXX 2017a; IDEXX 2017b.) Colilert-menetelmää käytettäessä tulokset varmistuvat 18–24 tunnin kuluessa analyysin aloittamisesta. Inkubointi tapahtuu 35–36 asteessa. Analyysin tekijälle menetelmän käyttö on helppoa; näytteen saa inkuboitumaan alle minuutissa. (Pitkänen ym. 2009, 3–4; IDEXX 2017a.)



Kuva 1. Tulosten lukemista Colilert Quanti-Tray -liuskalta (IDEXX 2017b).

6.2 3M Petrifilm *E. coli* / Coliform Count Plate ja Select *E. coli* Count Plate

Petrifilmit ovat perinteisiä maljoja nopeampi ja vähemmän tilaa vievä vaihtoehto mikrobien määrittämiseen näytteestä. Filmit on alun perin suunniteltu elintarviketeollisuuden tarpeisiin mutta niillä voi myös testata esimerkiksi ympäristönäytteitä. (3M Food Safety 2013; 3M Food Safety 2010.)

3M *E. coli* / Coliform Count Plate -filmeillä (Kuva 2) voidaan määrittää *E. coli* ja koliformit 35 asteessa ja 24–48 tunnissa riippuen näytteestä. Filmissä on VRBL-agaria, hyttelöimisainetta sekä glukuronidaasi- ja tetrazolium-indikaattoria. Koliformipesäkkeet värjäytyvät alustalla punaisiksi ja glukuronidaasipositiiviset *E. coli* -kannat näkyvät sinisinä saostumina bakteeripesäkkeiden ympärillä. Pesäkkeet voidaan laskea filmiltä käsin tai siihen tarkoitukseen suunnitellulla lukijalla. (Labema n.d.a; 3M 2015.)



Kuva 2. 3M Petrifilm *E. coli* / Coliform Count Plate (3M 2017a).

3M Select *E. coli* Count Plate -filmeillä (Kuva 3) voidaan määrittää näytteestä *E. coli* 24 tunnissa 42 asteessa. Myös tällä alustalla *E. coli* -pesäkkeet värjäytyvät sinisiksi glukuronidaasipositiivisuudesta johtuen. (Labema n.d.b; 3M 2017b.)



Kuva 3. 3M Petrifilm Select *E. coli* Count Plate (3M 2017b).

6.3 Compact Dry EC

Compact Dry -kuivamaljat ovat valmiita kromogeenisia elatusainealustoja, joita on valmistettu mm. koliformien ja *E. coli* n määrittämiseen: Compact Dry EC (Kuva 4). Compact Dry -maljoja käytetään mm. tuotteiden sekä pintahygienian laadun analysointiin. Näytettä pipetoidaan maljalle, tai maljalle voidaan ottaa pintanäyte painamalla sitä kohdetta vasten. Tulokset valmistuvat 24–48 tunnin inkuboinnin jälkeen maljatyypistä riippuen. Compact Dry EC -maljoilla on kaksi kromogeenista substraattia: Magenta-Gal (koliformit) ja X-Gluc (*E. coli*). Maljoilta lasketaan sinisiksi värjäytyneet *E. coli* -pesäkkeet sekä punaisiksi värjäytyneet koliformipesäkkeet. (Labema n.d.c; Hardy Diagnostics 2017a.)



Kuva 4. Tulosten laskemista Compact Dry EC -kuivamaljalta (Hardy Diagnostics 2017b).

6.4 EnSURE ja MicroSnap *E. coli*

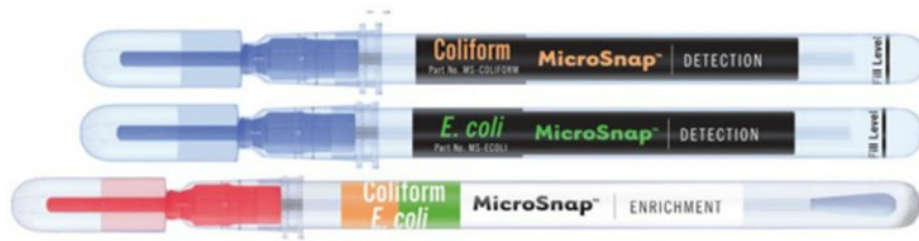
Hygienan EnSURE-luminometri (Kuva 5, s. 13) on valmistajan mukaan markkinoiden herkin valodiodiluminometri ja se soveltuu erityisen hyvin MicroSnap-testien tekemiseen (Net-Foodlab Oy n.d.a). Luminometrien toimintaperiaate perustuu luminometriaan eli ATP-mittaukseen. ATP-molekyylä eli adenosiniitrifosfaatti kuuluu osana kaikkien solujen energia-aineenvaihduntaan. ATP:llä on kyky tuottaa valoa reagoidessaan lusiferiinin kanssa reaktiossa, jossa lusiferaasi-entsyymi toimii katalyyttinä, ja ”syntyvän valon määrä on suorassa suhteessa näytteen sisältämään solumäärään ja se mitataan luminometrillä”. (Net-Foodlab Oy n.d.b.) Luminometriaa käytetään erityisesti pintapuhtauden analysoinnissa. Monet

pintapuhtauden analysointiin tarkoitetuista luminometreista käyttää ”singleshot”-reagensseja. ”Singleshot”-reagenssit ovat näytepuikkoja, jotka sisältävät näytteenottopuikon sekä kaikki analyysiin tarvittavat reagenssit ja mittaus voidaan tehdä laittamalla koko näytepuikko luminometriin. EnSURE-luminometrilla näytepuikon tulos saadaan 15 sekunnissa. (Net-Foodlab Oy n.d.b; Hygiena n.d.a.)



Kuva 5. Hygienan EnSURE-luminometri (Hygiena 2017).

Hygienan MicroSnap-testit ovat nopeita bioluminesenssiin perustuvia menetelmiä. MicroSnap soveltuu pintojen (koneet, laitteet, kädet jne.) sekä nesteiden ja kiinteiden aineiden hygienian analysointiin. (Net-Foodlab Oy n.d.c.) MicroSnapilla tulokset analysoitavasta näytteestä saadaan joko 6–7 tai 8 tunnin inkuboinnin jälkeen. 6–7 tunnissa saadaan selville mikrobien lukumäärä ja 8 tunnin inkuboinnilla voidaan varmistaa, sisältääkö näyte tutkittavia mikrobeja vai ei. MicroSnap-testejä on *E. colin* ja koliformien (Kuva 6, s. 14) sekä enterobakteerien ja kokonaisbakteerien analysoimista varten. (Hygiena n.d.b.)



Kuva 6. 1. alhaalta MicroSnap Coliform & *E. coli* -rikastuspuikko, 1. ja 2. ylhäältä Coliform- ja *E. coli* -detektiopuikot (Food Processing Technology 2017).

E. coli testaamista varten analysoitavaa näytettä pipetoidaan ensin rikastuspuikkoon tai rikastuspuikolla sivellään analysoitavaa pintaa. Rikastuspuikkoa inkuboidaan 6 (kvantitatiivinen tulos) tai 8 (kvalitatiivinen tulos) tuntia 37 asteessa, jonka jälkeen rikastuspuikon sisältöä pipetoidaan detektiopuikkoon. Detektiopuikkoa inkuboidaan 10 minuuttia 37 asteessa, jonka jälkeen puikko laitetaan luminometriin ja luminometri ilmoittaa tuloksen RLU-arvona (Relative Light Unit). RLU-arvot ovat muunnettavissa niitä vastaaviksi pesäkettä muodostaviksi yksiköiksi millilitrassa näytettä (pmy/ml) Hygienan MicroSnap Coliform & *E. coli* -menetelmäohjeessa (2014) olevan taulukon avulla. (Hygiena 2014.) EnSURE-luminometri voi havaita MicroSnap *E. coli* -testistä suoralla mittauksella (10 minuutin inkubointi) 10 000–100 000 pmy/ml *E. coli* -pitoisuuksia ja 6 tunnin inkuboinnilla jopa 1–5 pmy/ml *E. coli* -pitoisuuksia (Net-Foodlab Oy n.d.c).

7 KÄYTETYT MENETELMÄT JA ESIVALMISTELUT

Tässä opinnäytetyössä selvitettiin rejektiviesilannoitteen mahdollisia kontaminaatioreittejä ja -syitä sekä tutkittiin EnSURE-luminometrin ja MicroSnap *E. coli* -testin soveltuvuutta rejektiviesilannoittelelle. Kontaminaatioreittien ja -syiden selvittämiseksi kerättiin neste-, pinta- ja ilmanäytteitä, joista tehtiin mikrobianalyysijä valmiiksi valetuilla maljoilla, perinteisillä maljaviljelyillä sekä petrifilmeillä. Myös luminometrin testauksen rinnalla käytettiin tukena maljaviljelyitä ja petrifilmejä. Jotta mikrobianalyysijä voitiin alkaa tehdä, tuli rejektiviesilannoitteen pH:n säätöön ja suodatuvuuteen tutustua ensin.

7.1 Mikrobianalyysit

Tämän opinnäytetyön laboratoriotöissä käytettiin erilaisia elatusaineita ja petrifilmejä eri mikrobien analysoimiseen. *E. coli* ja koliformit analysoitiin Chromocult-elatusaineella (Chromocult Coliform Agar ES), aerobiset kokonaisbakteerit THG:llä (tryptoni-hiivauute-glukoosiagar), johon lisättiin natamysiiniä estämään homeiden ja hiivojen kasvua sekä homeet ja hiivat 2 % mallasuuteagarilla (2 % Malt Extract Agar, LAB550), johon lisättiin

kloramfenikolia estämään bakteerien kasvua paitsi kesäkuun näytteissä. Näiden lisäksi joidenkin näytteiden analyysien tukena käytettiin myös 3M petrifilmejä SEC (Select *E. coli*) *E. colille*, EC (*E. coli* / Coliform Count Plates) *E. colille* ja koliformeille, AC (Aerobic Count Plates) aerobisille kokonaisbakteereille ja YM (Yeast and Mold Count Plates) homeille ja hiivoille. (Taulukko 1.)

Taulukko 1. Mikrobianalyyseissä käytetyt elatusaineet ja petrifilmit

Alusta	Koliformit	<i>E. coli</i>	Aerobiset kokonaisbakteerit	Homeet ja hiivat
Chromocult	x	x		
Petrifilm EC	x	x		
Petrifilm SEC		x		
THG + natamysiini			x	
Petrifilm AC			x	
2 % mallasuuteagar*				x
2 % mallasuuteagar + kloramfenikoli				x
Petrifilm YM				x

*Kesäkuun 2017 analyyseissä ei kloramfenikolia

Laitokselta kerättiin kesällä kolmenlaisia näytteitä: neste-, pintasively- sekä ilmanäytteitä.

Nestenäytteet otettiin steriileihin muoviastioihin, joissa ne kuljetettiin laboratorioon pakastimeen tai kylmäsäilytykseen. Nestenäytteet analysoidiin viimeistään kolmen päivän kuluessa näytteenotosta. Nestenäytteistä tehtiin maljaviljelyitä, joita varten näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista laimennossarjaa peptonisuolaveteen. Näytteen sekä peptonisuolaveden pH säädettiin eri elatusaineiden ja petrifilmien vaatimiin arvoihin joko 1-molaarisella natriumhydroksidilla (NaOH) tai 1-molaarisella rikkihapolla (H₂SO₄). Maljaviljelyiden tulokset laskettiin Eviran mikrobiologisten tulosten laskemisohjeen LAB 703/3 (2011) mukaan.

Pintasivelynäytteet otettiin kertakäyttöisillä, steriileillä näytteenotto-puikoilla valmiiksi valetuille elatusainemaljoille. Pintanäytteet pyrittiin otamaan aina samalla tavalla (sivelytekniikka), jotta tulokset pysyivät luotettavina. Pintasivelynäytemaljat toimitettiin näytteenoton jälkeen mahdollisimman nopeasti inkubointiin. Pintasivelynäytteiden tulokset olivat kvalitatiivisia eli näytteitä ei otettu tietyn suuruiselta pinta-alalta eikä otetuista näytteistä tehty laimennossarjoja. Maljoille kasvaneita pesäkkeitä ei mikroskopoitu vaan niitä ja niiden määrää tulkittiin silmämääräisesti.

Ilmanäytteet otettiin valmiiksi valetuille elatusainemaljoille. Ilmanäytteiden keräämiseen käytettiin Andersen-keräintä eli 6-vaiheimpaktoria. Näytteenoton ajaksi keräimeen asetettiin jokaiselle tasolle (6 tasoa) kaneton elatusainemalja. Ilmanäytteiden näytteenottoaika oli 10 minuuttia ja ilmavirtaus 28,3 litraa minuutissa. Näytteenoton jälkeen keräimen kaikki tasot pyyhittiin 70 % etanolilla ennen uusien maljojen asettamista keräimeen. Näytteenoton jälkeen kaikki maljat toimitettiin mahdollisimman nopeasti inkubointiin. Inkuboiduilta maljoilta laskettiin pesäkkeiden lukumäärä ja keräimen tasoilla 3–6 olleiden maljojen eli vaiheiden 3–6 pesäkkeiden lukumäärät korjattiin Sosiaali- ja terveysministeriön asumisterveysohjeessa (2003, 90) olevan 6-vaiheimpaktorin korjaustaulukon mukaan. Korjauksen jälkeen näytteen mikrobipitoisuus laskettiin asumisterveysohjeessa (2003, 87) olevan laskentakaavan mukaan.

Taulukossa 2 on esitetty eri elatusaineiden ja petrifilmien inkubointilämpötilat ja -ajat, joita käytettiin tämän työn analyyseissä. Pintasively- ja ilmanäytteistä viljeltyjen aerobisten kokonaisbakteerien sekä homeiden ja hiivojen inkubointiolosuhteet pyrittiin valitsemaan laitoksella kesällä valitsevien, todellisten olosuhteiden mukaan eli inkubointilämpötilaksi valittiin 25 astetta (tai huoneenlämpö). Joidenkin näytteiden kohdalla käytettiin taulukosta 2 poikkeavia arvoja, ja ne on ilmoitettu aina erikseen näytteiden tulostaulukoissa luvussa 10.

Taulukko 2. Elatusaineiden ja petrifilmien inkubointiolosuhteet

Alusta	Lämpötila (°C)	Aika
Chromocult	37	48 h
Petrifilm EC	37	48 h
Petrifilm SEC	42	24 h
THG (pinta, ilma)	25	7 vrk
THG (neste)	35	48 h
Petrifilm AC	35	48 h
2 % mallasuuteagar (pinta, ilma)	25	7 vrk
2 % mallasuuteagar (neste)	25	5 vrk
Petrifilm YM	25	5 vrk

7.2 Rejktivesilannoitteen pH:n säätö ja suodattuvuus

Tässä opinnäytetyössä tutkimuksen kohteena oli rejktivesilannoite. Kyseessä oli St1 Renewable Energy Oy:n Bionolix Lannoite, joka on tyyppinimeltään rejktivesi. Tuotteen kuiva-ainepitoisuus on 15 %. (St1 2017.) Rejktivesi on ulkonäöltään sameaa, tummanruskeaa lientä. Laitokselta ilmoitettiin, että rejktiveden pH on noin 5 ja sen laatu on keskimäärin taseista ympäri vuoden.

Laitokselta toimitettiin toukokuussa 2017 rejektivesinäyte tutustumista varten. Koska rejektivesi on hapanta, sen pH:n säätöä tuli testata, jotta voitiin varmistaa tulevien mikrobianalyysien ja kokeiden onnistuvuus. pH:ta säädettiin 1-molaarisella natriumhydroksidilla neutraaliksi ja todettiin, että rejektiveden pH ei laske kolmen vuorokaudenkaan kuluessa merkittävästi. pH:ta säädettiin tämän jälkeen eri elatusaineiden ja petrifilmien sekä luminometrin testauksessa käytettävän MicroSnap-testin vaatimiin arvoihin. MicroSnap *E. coli* -testissä näytteen pH:n tulee olla 7,8. Pipetointi tehtiin suurpiirteisesti pipetoimalla aina pieni määrä natriumhydroksidia tiettyyn määrään rejektivettä. Lopulta saatiin selville eri pH-arvoihin pääsemiseksi vaadittava natriumhydroksidin määrä (Taulukko 3). Nämä mittaukset suoritettiin pH-mittarilla. Jatkossa laboratoriotöissä pH:n tarkistamiseen käytettiin pH-paperia. 1-molaarista rikkihappoa käytettiin alentamaan pH:ta silloin, kun rejektiveden pH oli säädetty liian korkeaksi.

Taulukko 3. Rejektiveden (10 ml) pH:n säätö natriumhydroksidilla (NaOH)

Haluttu pH	Tarvittava NaOH (μl) / 10 ml rejektivettä
5,4	50
7,0	150
7,8	250

Myös rejektiveden suodattuvuutta testattiin toukokuussa 2017. Testauksessa käytettiin perinteistä kalvosuodatusmenetelmää (suodatinpaperin huokoskoko 0,45 μm). Suodatus ei onnistunut, jolloin voitiin poissulkea kalvosuodatustekniikan hyödyntäminen EnSURE-luminometrin ja MicroSnap-testin soveltuvuutta selvittäessä.

8 TYÖN TOTEUTUS – KONTAMINAATIOREITTIIEN JA -SYIDEN SELVITTÄMINEN

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää rejektivesilannoitteen mahdolliset kontaminaatioreitit ja -syyt. Rejektivesilannoitteen indikaattoriorganismit ovat *Escherichia coli*, salmonella sekä juuripoltesieni. Tässä työssä indikaattoriorganismit tai -mikrobiksi valittiin *E. coli*.

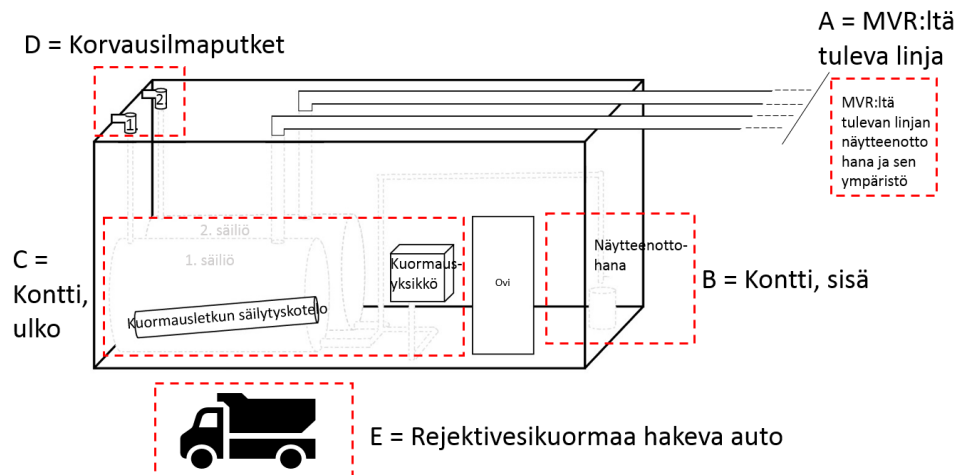
Mikrobianalyysit tehtiin Hämeen ammattikorkeakoulun Visamäen kampuksen B-rakennuksen mikrobiologian laboratoriossa. Analysoitavat näytteet kerättiin St1 Renewable Energy Oy:n Hämeenlinnan tuotantolaitokselta. Laitokselta käytiin ottamassa näytteitä kesä-, heinä- ja elokuussa 2017. Laitokselta toimitettiin kesän aikana myös muita näytteitä laboratorioon analysoitavaksi. Ennen ensimmäistä näytteenottoa tehtiin näytteenottosuunnitelma, joka helpotti näytteiden keräämistä.

8.1 Näytteenottosuunnitelma

Ennen ensimmäistä näytteenottoa tehtiin vapaamuotoinen näytteenottosuunnitelma, jossa määriteltiin, minkälaisia näytteitä otetaan ja mistä pisteistä näytteitä kannattaa ottaa. Suunnitelman perusteella osattiin myös varata riittävä määrä tarvikkeita ja maljoja näytteiden ottamista ja analysointeja varten. Näytteitä päätettiin ottaa kolmenlaisia: pintasively-, ilma- ja nestenäytteitä. Näytteitä otettiin laitokselta kolmena eri ajankohtana: kesäkuussa, heinäkuussa ja elokuussa 2017. Tarkemmat näytteenottopäivät sovittiin lähempänä haluttua ajankohtaa, muutamaa päivää ennen rejektivesikuorman hakua. Säätila tuli ottaa huomioon, koska sateisena päivänä ilmanäytteiden ottaminen ei olisi onnistunut.

Kannattavia näytteenottopisteitä varten saatiin neuvoja laitoksen henkilökunnalta, mikä helpotti suunnitelman tekemistä. Näytteenottoalueista piirrettiin havainnollistava kuva (Kuva 7, s. 19). Kuva ei ole mittakaavassa eikä se ole tarkka kuvaus rejektivesäiliöiden sijainnista. Kuvan tarkoitus oli selventää ja yksinkertaistaa näytteenottoalueiden hahmotettavuutta, mikä helpotti myös saatujen tulosten ymmärrettävyyttä. Näytteenottopisteet voitiin jakaa viidelle alueelle, A–E (Kuva 7, s. 19). Ensimmäinen alue, A, oli näytteenottohana ja sen ympäristö putkilinjalla, jossa rejektivesi tulee suoraan MVR:ltä (Mechanical Vapor Recompression) eli tuotteen prosessoinnin viimeisestä vaiheesta (Kuva 7, s. 19). Rejektivesi jatkaa tästä kulkuun varastosäiliöihin, jotka sijaitsevat eri rakennuksessa. Tätä rakennusta kutsuttiin varastosäiliökontiksi, jossa sijaitisivat muut näytteenottoalueet.

Varastosäiliökontti oli näytteiden oton kannalta tärkein alue, sillä siellä sijaitisivat kontaminoitumisen kannalta kaikkein potentiaalisimmat pisteet. Alue B oli konttirakennuksen sisällä oleva näytteenottohana ja sen ympäristö (Kuva 7, s. 19). Alue C oli kontin ulkopuolella seinässä oleva kaappi eli kuormausyksikkö, jossa on mm. putkilinja ja hana rejektiveden kuormauksista varten (Kuva 7, s. 19). Alueelle C kuului myös samalla ulkoseinällä kuormaamista varten tarkoitettu letku ja sen säilytysteline (Kuva 7, s. 19). Konttirakennuksen katolla sijaitsevat kaksi säiliöiden korvausilmaputkea (Kuva 7, s. 19) muodostivat neljännen näytteenottoalueen D. Viides näytteenottoalue E oli rejektivesikuormia hakevat autot (Kuva 7, s. 19). Auto ei ollut aina sama jokaisella kuormanhakukerralla vaan ne vaihtelivat. Autot kuuluvat ulkopuoliselle kuljetusyritykselle eli St1 ei vastaa rejektivesilannoitteen kuljettamisesta asiakkaille.



Kuva 7. Havainnekuva näytteenottoalueista A–E (Kuva: Keskinen 2017).

8.2 Näytteenotot

Näytteitä käytiin ottamassa laitokselta kesäkuussa 13.–14.6.2017, heinäkuussa 18.7.2017 ja elokuussa 15.8.2017.

Kesäkuun näytteenotto suoritettiin kahtena päivänä. 13.6. otettiin pintasivelynäytteitä sekä nestenäytteitä. Ilmanäytteet otettiin 14.6. Tuolloin otettiin myös lisää pintasivelynäytteitä. Näytteet pyrittiin ottamaan lyhyen ajan sisällä, jotta näytteet saatiin mahdollisimman tuoreina inkubointiin.

Ensimmäisten näytteiden ottaminen oli haastavaa, koska varsinaisten näytteenottohanojen ja -putkien sekä korvausilmaputkien lisäksi näytteenottoalueiden ympäristössä oli paljon muitakin pintoja, jotka saattoivat olla otollisia mikrobien leviämisaikoja. Tämän vuoksi pintasivelynäytteitä otettiin ensimmäisellä näytteenottokerralla monesta sellaisestakin paikasta, joita ei ollut kirjattu näytteenottosuunnitelmaan.

Heinä- ja elokuussa näytteet otettiin kuten kesäkuussakin. Pintasivelynäytteitä otettiin vähemmän, koska kesäkuun tulosten perusteella voitiin poissulkea joitakin pisteitä, jotka eivät osoittautuneet kontaminoitumisen kannalta merkityksellisiksi.

8.2.1 Pintasivelynäytteet

Pintasivelynäytteet otettiin aseptisesti steriloidussa vedessä kostutetuilla näytteenottopuikoilla (pumpulipuikko) ja siveltiin heti paikan päällä valmiiksi valetuille maljoille (Kuva 8, s. 20). Pintasivelynäytteistä analysoitiin *E. coli* ja koliformit, aerobiset kokonaisbakteerit sekä homeet ja hiivat. Pintasivelynäytteiden tarkoituksena ei ollut määrittellä tarkkoja mikrobimääriä

eri kohteissa vaan saada kvalitatiivisia tuloksia kohteissa esiintyvistä mikrobiryhmistä.

Pintasivelynäytemaljoja säilytettiin näytteenoton ajan kylmälaukussa ja ne toimitettiin näytteenoton päätyttyä mahdollisimman nopeasti (alle 4 tunnissa) mikrobiologian laboratorioon inkubointiin.

Kesäkuun tulosten perusteella heinä- ja elokuun pintasivelynäytteiden otto osattiin kohdentaa sellaisiin pisteisiin, joissa oli joko havaittu *E. coli* tai joissa oli muuten suuria mikrobimääriä. Sellaisista pisteistä ei välttämättä enää otettu näytteitä, jotka todettiin kesäkuun tulosten perusteella merkityksettömiksi mahdollisen kontaminoitumisen kannalta.



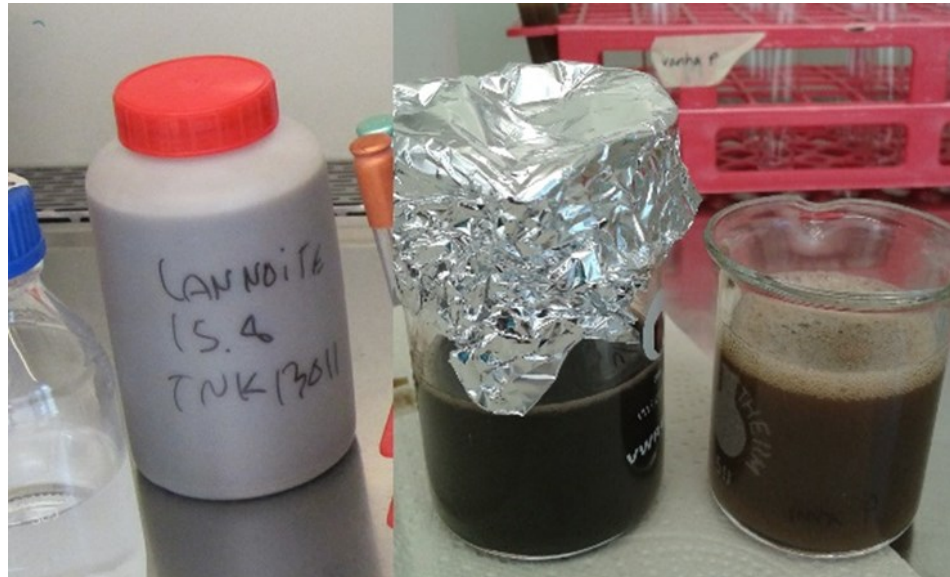
Kuva 8. Esimerkkikuva pintanäytteen sivelestä maljalle (Kuva: Laine 2017).

8.2.2 Nestenäytteet

Nestenäytteitä otettiin kesäkuussa kolmesta eri paikasta: suoraan MVR:ltä lähtevän rejektiveden näytteenottohanasta alueelta A (Kuva 7, s. 19), varastosäiliökontin näytteenottohanasta alueelta B (Kuva 7, s. 19) sekä kuormausyksikön hanasta alueelta C (Kuva 7, s. 19). Kuormausyksikön hanasta näyte otettiin kuormaustapahtuman päätyttyä. Muista hanoista näytteitä otettaessa rejektivettä valutettiin ensin muutama litra ämpäriin, jonka jälkeen voitiin ottaa edustava näyte analysoitavaksi. Kaikki nestenäytteet otettiin muovipulloihin, jotka oli steriloitu autoklaavissa (Kuva 9, s. 21). Kesäkuun nestenäytteet pakastettiin näytteenoton jälkeen. Analysoinnit tehtiin seuraavan kolmen päivän kuluessa.

Heinäkuussa otettiin vain yksi nestenäyte. Näyte otettiin kuormaustapahtuman päätyttyä kuormausletkun kautta. Elokuussa otettiin jälleen kolme

nestenäytettä kuten kesäkuussa. Kuormausyksiköstä otettava nestenäyte otettiin kuitenkin kuormausletkun kautta kuten heinäkuussa. Heinä- ja elokuun näytteitä säilytettiin kylmiössä. Näytteet analysoitiin kolmen vuorokauden sisällä näytteenotosta.

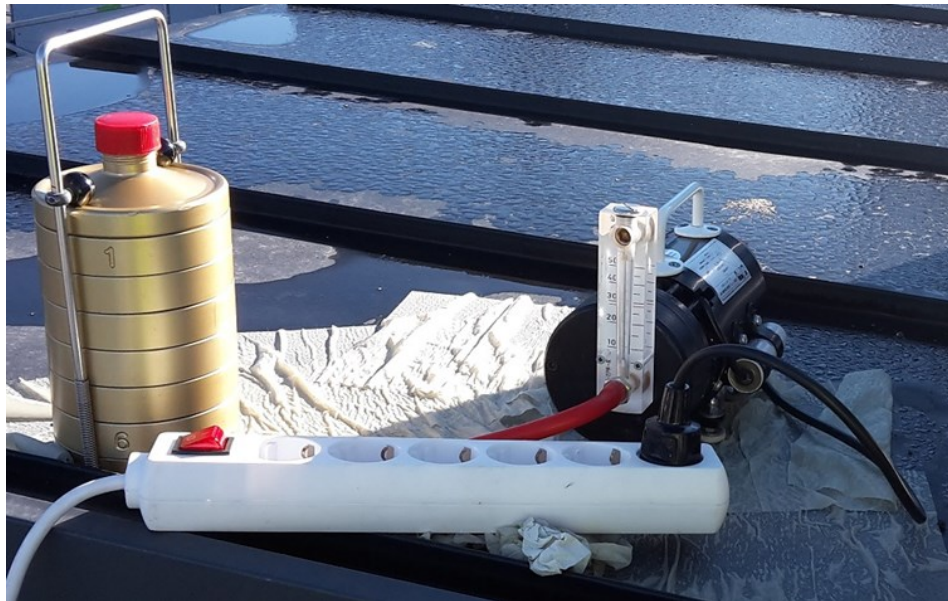


Kuva 9. Esimerkkikuva rejektivesinäytteestä näytteenottoastiassaan ja dekantterissa (Kuva: Keskinen 2017).

8.2.3 Ilmanäytteet

Ilmanäytteet otettiin varastosäiliökontin katolla olevien korvausilmaputkien välittömässä läheisyydessä alueelta D (Kuva 7, s. 19). Ilmanäytteet otettiin ennen rejektiveden kuormautusta ja kuormauksen aikana. Tarkoituksena oli selvittää, leviääkö kuormauksen aikana kuormaavan auton säiliön korvausilmaputkesta mikrobeja ilmaan niin paljon, että ne voisivat levitä rejektivesäiliöiden korvausilmaputkien kautta rejektiveteen aiheuttaen kontaminaation. Tulosten perusteella pystyttiin myös arvioimaan ilman mikrobipitoisuutta yleisesti.

Ilmanäytteet otettiin Andersen-keräimellä eli 6-vaiheimpaktorilla (Kuva 10, s. 22) valmiiksi valetuille maljoille (Chromocult, THG ja 2 % mallasuuteagar). Näytteenottoaika oli 10 minuuttia 28,3 l/min ilmapirralla. Poikkeuksena oli elokuun 2 % mallasuuteagarmaljat, joille näytteenottoaika oli vain 5 minuuttia. Aikaa lyhennettiin, koska heinäkuussa huomattiin kyseisten maljojen kasvavan umpeen jo ennen inkubointiajan päättymistä.



Kuva 10. Andersen-keräin eli 6-vaiheimpaktori valmiina ottamaan ilmanäytteitä (Kuva: Laine 2017).

8.3 Viikkonäytteet ja muut näytteet

Laitokselta toimitettiin laboratorioon varastosäiliökontin näytteenottohanasta, alueelta B (Kuva 7, s. 19) otettu nestenäyte joka viikko 19.7.2017 ja 22.8.2017 välisellä ajanjaksolla. Tältä ajalta kertyi kuusi näytettä, joiden analyysitulosten perusteella pystyi hyvin tarkkailemaan viikoittaisia muutoksia rejektiveden laadussa. Näytteistä analysoitiin *E. coli* ja koliformit maljaviljelyllä. Kolmesta viimeisestä näytteestä analysoitiin myös aerobiset kokonaisbakteerit petrifilmeillä. Kaikki näytteet analysoitiin tuoreina, alle 12 tuntia näytteenotosta, paitsi 15.8. otettu näyte yhden vuorokauden kuluttua näytteenotosta. Näytteitä säilytettiin kylmiössä.

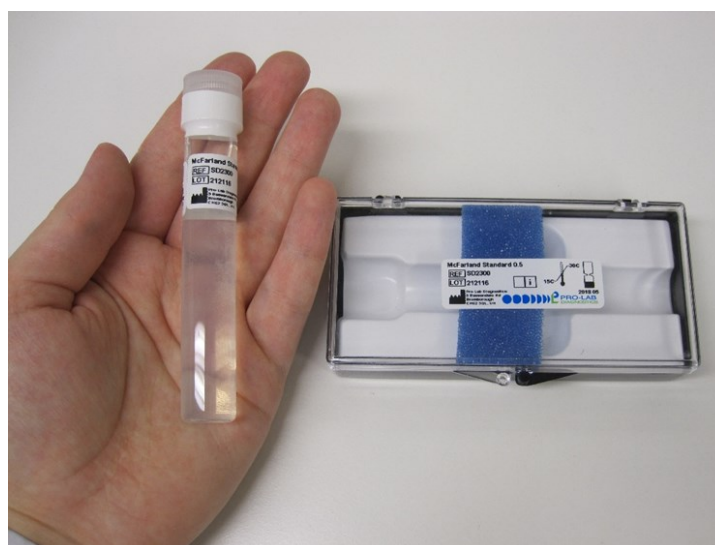
Laboratorioon toimitettiin 10. ja 11.8.2017 kaksi ylimääräistä nestenäytettä, koska MVR:llä oli tehty huoltotoimenpiteitä. Huollon jälkeen suoritettiin pesuja, jotta huollon aikana linjaan mahdollisesti päässeet mikrobit voitiin tuhota. Nestenäytteistä saatavien tulosten perusteella saatiin selville, olivatko pesut olleet tarpeeksi tehokkaita. 10.8. toimitettiin näyte MVR:n syöttösäiliöstä ja 11.8. näyte MVR:n jälkeen sijaitsevasta näytteenottohanasta alueelta A (Kuva 7, s. 19). Molemmista näytteistä analysoitiin *E. coli* ja koliformit maljaviljelyllä sekä aerobiset kokonaisbakteerit petrifilmeillä. Näytteet analysoitiin tuoreina (alle 12 tuntia näytteenotosta).

9 TYÖN TOTEUTUS – ENSURE-LUMINOMETRIN JA MICROSNAP *E. COLI* -TESTIN SOVELTUVUUS REJEKTIVEDELLE

Opinnäytetyön tilaaja toivoi rejektivesilannoitteen laadunhallintaan Ensure-luminometri MicroSnap *E. coli* -testillä. Ennen työn toimeksiantoa ja työn toteutuksen aikana laitokselta lähetettiin rejektivesinäytteitä ulkopuoliseen laboratorioon analysoitavaksi perinteisin maljaviljelyin. Maljaviljelyillä tulokset valmistuvat melko hitaasti mutta edellä mainitulla luminometrillä ja MicroSnap-testillä tulokset valmistuisivat jopa yhden työvuoron aikana. Rejektiveden alhainen pH ja sameus asettivat alkuun epäilyjä menetelmän toimivuudelle. pH:n säätöä rejektivedelle testattiin jo toukokuussa 2017 ja todettiin, että pH:n säätö onnistuu ilman ongelmia.

Kaikki pikamenetelmälle tehdyt kokeet toteutettiin Hämeen ammattikorkeakoulun Visamäen kampuksen B-rakennuksen mikrobiologian laboratoriossa. Ensimmäisen kokeen tulosten selvittyä todettiin, että on tarpeen tehdä ainakin toinen koe. Toinen koe onnistui jo paremmin kuin ensimmäinen ja sen tulokset näyttivät lupaavia merkkejä menetelmän toimivuudesta, joten lopuksi päätettiin tehdä vielä kolmas koe. Ennen ensimmäistä koetta menetelmää oli testattu heinäkuun *E. coli*a sisältäneelle nestenäytteelle mutta tulokset näyttivät nollaa.

Jokaista koetta varten kasvatettiin PCA-maljalla (Plate Count Agar) *E. coli* -kontrollikantaa ATCC 8739, joka toimi tehdyissä kokeissa ymppinä. Alle vuorokauden 35 asteessa kasvatetulta maljalta otettiin siirrostussilmukalla tuoretta *E. coli* -kasvustoa peptonisuolavettä sisältävään lasiputkeen. Tarkoituksena oli valmistaa solususpensio, joka vastasi silmämääräisesti sameudeltaan McFarlandin standardi nro 0.5 (Kuva 11) sameutta. McFarlandin standardi nro 0.5 sameus vastaa pitoisuudeltaan $1,5 \times 10^8$ pmy/ml solususpensiota. Tässä työssä käytettiin valmista standardiliuosta (Pro-Lab Diagnostics) mutta liuoksia voi valmistaa myös itse.



Kuva 11. McFarlandin standardi nro 0.5 (Kuva: Keskinen 2017).

Kun haluttu sameus oli saavutettu, saadusta solususpensiosta tehtiin *E. coli* -laimennussarja (Taulukko 4). Laimennussarjalla ympätettiin rejektive-sinäytteitä, jotka eivät sisältäneet *E. coli*a. Laimennussarjasta tehtiin myös maljaviljelyitä tai petrifilmejä, joista saatuja tuloksia voitiin vertailla ympätyistä rejektivesistä saatuihin tuloksiin.

Taulukko 4. *E. coli* -laimennussarjan tavoitellut *E. coli* -pitoisuudet

Putki nro	<i>E. coli</i> -pitoisuus (pmy/ml)		Laimennos
1	*150 000 000	* $1,5 \times 10^8$	0
2	15 000 000	$1,5 \times 10^7$	-1
3	1 500 000	$1,5 \times 10^6$	-2
4	150 000	$1,5 \times 10^5$	-3
5	15 000	$1,5 \times 10^4$	-4
6	1 500	$1,5 \times 10^3$	-5
7	150	$1,5 \times 10^2$	-6
8	15	$1,5 \times 10^1$	-7
9	1,5	$1,5 \times 10^0$	-8

*McFarland 0.5 -putkea vastaava pitoisuus tai sameus

MicroSnap *E. coli* -testiä tehdessä tutkittavaa näytettä pipetoitiin ensin 1 ml rikastuspuikkoon ja puikossa oleva rikastusliemi lisättiin ja sekoitettiin näytteen joukkoon katkaisemalla puikon ylempi kärki. Rikastuspuikkoja inkuboitui 6 tuntia (kvantitatiivinen tulos) 37 asteessa (Kuva 12, s. 25). Inkuboinnin jälkeen rikastuspuikkoja jäähdytettiin huoneenlämmössä 10 minuuttia, jonka jälkeen rikastuspuikoista pipetoitiin puikon sisäosan avulla inkuboitua näytettä detektiopuikkoon sen merkkiviivaan asti (3 tippaa tai 0,1 ml). Detektiopuikon ylemmässä kärjessä oleva liemi lisättiin ja sekoitettiin pipetoidun näytteen joukkoon. Detektiopuikkoja inkuboitui 10 minuuttia 37 asteessa (Kuva 12, s. 25), jonka jälkeen puikot luettiin välittömästi EnSURE-luminometrillä yksi kerrallaan, ja luminometrin antamat tulokset (RLU-arvo) kirjattiin muistiin.



Kuva 12. Esimerkkikuva rikastus- ja detektiopuikoista inkuboinnissa (Kuva: Keskinen 2017).

9.1 Ensimmäinen koe

Ensimmäinen koe tehtiin 28.7.2017. Kokeessa ympättiin 25.7.2017 laitokselta otettua rejektivesinäytettä *E. coli* -laimennussarjan eri laimennosputkilla. *E. coli* -laimennussarjalle ja eri pitoisuuksilla ympätyille rejektivesiputkille tehtiin MicroSnap *E. coli* -testi sen ohjeiden mukaisesti ja tulokset luettiin luminometrillä. *E. coli* -laimennussarjasta sekä ympätyistä rejektivesiputkista tehtiin myös viljelyt SEC-petrifilmeille. Luminometrillä ja petrifilmeillä saatiin luotettava tulos *E. coli* -sarjan nollaputken *E. coli* -pitoisuudelle mutta ympätyn rejektiveden tulokset näyttivät nollaa tai lähes nollaa. Laimentamaton rejektivesi on ruskeaa ja sameaa, joten petrifilmeiltä ei pystynyt erottamaan mahdollisia kasvaneita pesäkkeitä. Rejektiveden sameutta alettiin epäillä syyksi sille, miksi luminometrin antamat tulokset näyttivät nollaa tai lähes nollaa. Tämän vuoksi päätettiin suunnitella ja toteuttaa ainakin toinen koe, jossa rejektivettä lähdettiin laimentamaan RO-vedellä eri suhteissa. Ensimmäisen kokeen tulokset on esitetty opinnäytetyön liitteessä 1.

9.2 Toinen koe

Toinen koe tehtiin 29.8.2017. Kokeessa ympättiin 22.8.2017 laitokselta otettua rejektivesinäytettä. Kaikista *E. coli* -laimennussarjan putkista

tehtiin tällä kertaa ensin suoraan yhdet MicroSnap-detektiopuikot (10 minuuttia 37 asteessa), jotka luettiin luminometrilla. Detektiopuikkojen tulosten perusteella valittiin kaksi *E. coli* -sarjan laimennosputkea, tavoitelluilta pitoisuuksiltaan $1,5 \times 10^8$ pmy/ml (laimennos 0) ja $1,5 \times 10^7$ pmy/ml (laimennos -1), joilla lähdettiin ympppäämään rejektivettä. Rejektivedestä oli tehty ennen ympppäystä kaksi laimennussarjaa, joissa molemmissa rejektivettä oli laimennettu steriloidulla RO-vedellä 1:10, 1:30, 1:60, 1:90 ja 1:1000 (Kuva 13). Ensimmäistä sarjaa ympättiin *E. coli* -sarjan tavoitellulla pitoisuudella $1,5 \times 10^8$ pmy/ml ja toista sarjaa ympättiin tavoitellulla pitoisuudella $1,5 \times 10^7$ pmy/ml. Ympätyistä rejektivesiputkista tehtiin myös suoraan ensin detektiopuikot, ja tulokset luettiin luminometrilla. Tämän jälkeen *E. coli* -sarjan tavoitelluista pitoisuuksista $1,5 \times 10^8$ pmy/ml ja $1,5 \times 10^7$ pmy/ml sekä kaikista ympätyistä rejektivesiputkista tehtiin MicroSnap-testi kokonaisuudessaan sen ohjeiden mukaisesti (inkubointiaika 6 tuntia) ja tulokset luettiin luminometrilla. *E. coli* -laimennossarjasta tehtiin maljaviljelyt Chromocult-alustalle sekä SEC-petrifilmeille. Maljoilta ja filmeiltä saatujen tulosten avulla voitiin tarkistaa ja arvioida, kuinka hyvin *E. coli* -laimennussarjan tekeminen oli onnistunut ja mitä tuloksia (ainakin teoriassa) ympätyistä rejektivesiputkista olisi pitänyt saada.



Kuva 13. Havainnekuva rejektiveden erilaisista laimennussuhteista (Kuva: Keskinen 2017).

Kokeesta saatujen tulosten perusteella päätettiin tehdä vielä kolmas koe. Rejektiveden ympppäämiseen olisi pitänyt valita *E. coli* -pitoisuuksiltaan pienemmät kaksi putkea, koska nyt luminometrin ilmoittamat tulokset ylittivät MicroSnap-testissä annetun maksimitulosrajan, jolloin testissä ei päästy sopivalle herkkyysalueelle. Testistä saatiin kuitenkin suuntaa antavia tuloksia ja kokeessa selvisi, että ympätty, 1:30 laimennettu rejektivesi voisi antaa luotettavia tuloksia. Kolmas koe suunniteltiin näiden päätelmien perusteella.

9.3 Kolmas koe

Kolmas koe tehtiin 21.11.2017. Kokeessa ympättiin 1.8.2017 laitokselta otettua näytettä. Näytettä oli säilytetty pakastimessa. *E. coli* -sarjan putkista ei tehty tällä kerralla MicroSnap-testiä vaan pelkät maljaviljelyt Chromocult-alustalle. Koetta tehdessä päätettiin luottaa siihen, että *E. coli* -sarjan nollaputken sameus osattiin säätää juuri McFarland 0.5 -putken sameutta vastaavaksi. Tämän perusteella laskettiin, mitkä laimennossarjan putket olisivat sopivimmat rejektiveden ympppäämiseen, jolloin MicroSnap-testin tulokset eivät ylittäisi annettua maksimitulosrajaa eli ne olisivat sopivalla herkkyysalueella. *E. coli* -sarjasta valittiin ympiksi kaksi putkea, tavoitelluilta pitoisuuksiltaan $1,5 \times 10^4$ pmy/ml (laimennos -4) ja $1,5 \times 10^3$ pmy/ml (laimennos -5). Ennen ympppäystä rejektivedestä tehtiin jälleen kaksi laimennussarjaa. Tällä kertaa rejektivettä laimennettiin steriloidulla hanavedellä 1:30 ja 1:90. Sarjoihin lisättiin vielä kontrollinäytteiksi pelkkää steriloitua hanavettä sisältävät putket.

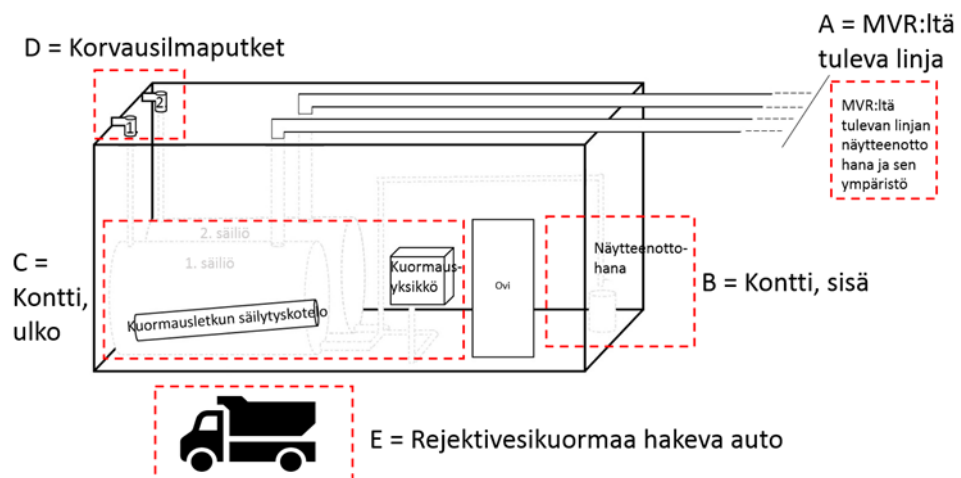
E. coli -sarjan tavoitelluilla pitoisuuksilla $1,5 \times 10^4$ pmy/ml ja $1,5 \times 10^3$ pmy/ml ympättiin rejektivesinäytteitä sekä vesinäytteitä. Kaikista ympätyistä näytteistä tehtiin kahdet testipuikot. Ensimmäisen rikastuspuikon inkubointiaika oli 0 tuntia ja toisen 6 tuntia. Detektiovaihe suoritettiin ohjeen mukaisesti, kuten aiemminkin kerroilla. 6 tuntia inkuboitujen puikojen tulosten perusteella valittiin kaksi parasta tulosta antanutta puikkoa maljaviljelyitä varten. Parhaimmiksi valittiin *E. coli* -laimennossarjan tavoitellulla pitoisuudella $1,5 \times 10^4$ pmy/ml ympätyt 1:90-rejektivesinäyte sekä vesinäyte. Näiden näytteiden rikastuspuikkojen liemistä tehtiin siis laimennussarjat ja maljaviljelyt.

E. coli -laimennussarjan tavoitellulla pitoisuudella $1,5 \times 10^4$ pmy/ml ympätyistä vesinäytteestä tehtiin myös maljaviljelyt. Tästä saaduilla tuloksilla saatiin selville, oliko ymppäys onnistunut.

10 TULOKSET – KONTAMINAATIOREITTIIEN JA -SYIDEN SELVITTÄMINEN

Kesän aikana laitokselta otettiin paljon erilaisia näytteitä, joista analysoitiin koliformeja, *E. colia*, aerobisia kokonaisbakteereja sekä homeita ja hiivoja. Pintasivelynäytteiden tulokset olivat kvalitatiivisia, ilma-, neste- ja viikkonäytteiden tulokset kvantitatiivisia. Ilmanäytteiden tulokset on laskettu ja ilmoitettu pesäkettä muodostavaa yksikköä yhtä kuutiometriä kohden (pmy/m³) ja neste- ja viikkonäytteiden tulokset pesäkettä muodostavaa yksikköä yhtä millilitraa kohden (pmy/ml). Tuloksissa on viitattu näytteenottoalueisiin A–E (Kuva 14, s. 28), joita kuvailtiin jo luvussa 8.1 sivuilla 18 ja 19. Tulosten ymmärrettävyyden helpottamisen vuoksi näytteenottoalueet kuvaillaan tässä uudelleen:

- A = Näytteet otettiin rejektiveden prosessoinnin viimeisestä vaiheesta eli MVR:ltä lähtevän linjan näytteenottohanasta ja sen ympäristöstä.
- B = Näytteet otettiin varastosäiliöiden konttirakennuksen sisäpuolella olevasta näytteenottohanasta ja sen ympäristöstä.
- C = Näytteet otettiin konttirakennuksen ulkopuolelta kuormausyksiköstä ja sen ympäristöstä sekä kuormausletkusta.
- D = Näytteet otettiin konttirakennuksen katolla sijaitsevista varastosäiliöiden korvausilmaputkista.
- E = Näytteet otettiin rejektivesikuormaa hakevasta autosta. Auto oli eri jokaisella näytteenottokerralla.



Kuva 14. Havainnekuva näytteenottoalueista A–E (Kuva: Keskinen 2017).

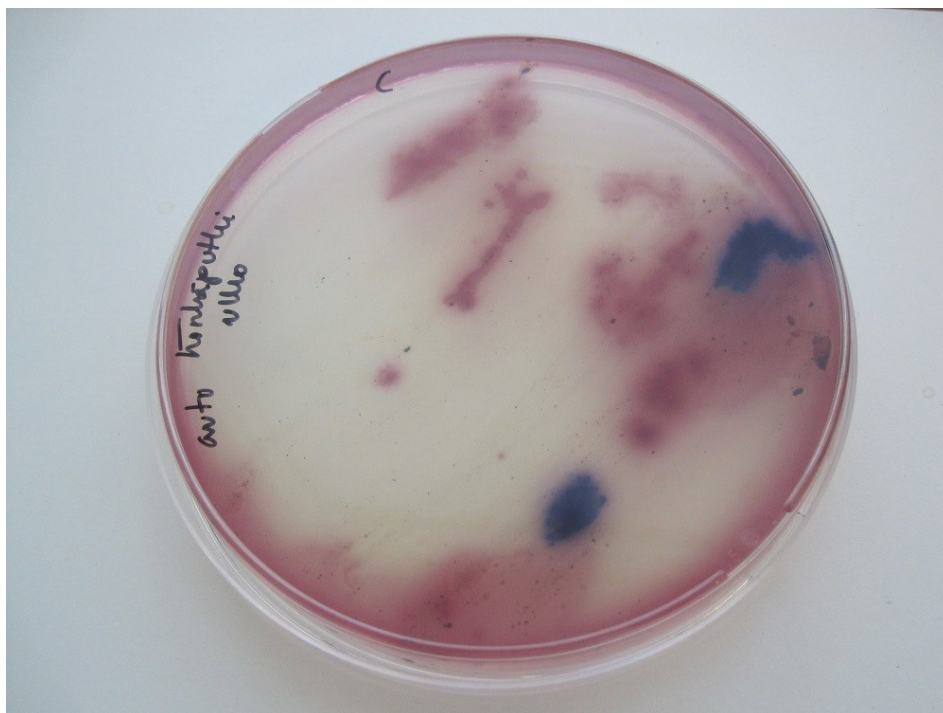
10.1 Pintasivelynäytteiden tulokset

Kaikkien pintasivelynäytteiden tulokset olivat kvalitatiivisia ja ne arvioitiin silmämääräisesti sen mukaan, kuinka voimakasta mikrobikasvustoa maljoilla esiintyi – ei ollenkaan kasvustoa, vähän kasvustoa, runsaasti kasvustoa (Kuva 15).



Kuva 15. Esimerkkikuva pintasivelynäytteiden tulosten tulkinnasta koliformeille (Kuva: Keskinen 2017).

Pintasivelynäytteissä esiintyneet *E. coli* -kasvustot olivat sen verran pieniä, että *E. coli* -havainnot ilmoitettiin kyllä-ei-periaatteella. Kuvassa 16 näkyy esimerkki sellaisesta pintasivelynäytteestä, jossa havaittiin *E. colia*.



Kuva 16. Esimerkkikuva pintasivelynäytteestä, jossa havaittiin *E. coli* -kasvustoa sinisinä pesäkkeinä (Kuva: Keskinen 2017).

Pintasivelynäytteiden tulokset koottiin taulukoihin ja tulokset ilmaistiin värikoodein sen mukaan, kuinka voimakasta kasvustoa maljoilla esiintyi ja esiintyikö *E. colia*. (Taulukko 5.)

Taulukko 5. Pintasivelynäytteiden tulosten värikoodien tulkinta

	= Ei kasvustoa
	= Vähän kasvustoa (kasvustoa alle puolet maljasta)
	= Runsaasti kasvustoa (kasvustoa yli puolet maljasta)
	= <i>E. coli</i> -kasvustoa
	= Näytettä ei otettu kyseisestä pisteestä

Kaikkien kuukausien tulokset koottiin taulukoihin näytteenottoalueiden A–E (Kuva 14, s. 28) mukaan. Alueilta C ja D (Kuva 14, s. 28) otettiin näytteitä ennen ja jälkeen kuormaustapahtuman, joten niiltä alueilta yhdistettiin ”ennen”- ja ”jälkeen”-näytteiden tulokset samaan taulukkoon. Pintasivelynäytteistä arvioitiin koliformit ja *E. coli*, aerobiset kokonaisbakteerit sekä homeet ja hiivat.

Näytteenottoalueelta A (Kuva 14, s. 28) ei löydetty kesän aikana *E. coli*. Koliformienkin määrä oli olematon tai hyvin vähäinen. Aerobisia kokonaisbakteereja sekä homeita ja hiivoja esiintyi vähän tai runsaasti. Näytteenottohanan sisäpuolella mikrobien määrä oli elokuussa suurempi kuin kesäkuussa. Tämä voi johtua elokuussa ennen näytteenottoa tapahtuneista prosessilinjoiden pesuista, joiden yhteydessä näytteenottohanalinja oli jouduttu purkamaan väliaikaisesti. Todennäköisesti tästä syystä putkessa oli enemmän mikrobeja kuin aiemmin. (Taulukko 6.)

Taulukko 6. Pintasivelynäytteiden tulokset näytteenottoalueelta A (Kuva 14, s. 28)

	Koliformit			<i>E. coli</i>			Aerobiset kokonaisbakteerit			Homeet ja hiivat		
A (MVR:ltä lähtevä linja)	K	H	E	K	H	E	K*	H	E	K*	H	E
Näytteenottohanan kahva												
Näytteenottohanan ulkopuoli												
Näytteenottohanan sisäpuoli												
Näytteenottohanan kohdalla oleva seinä												

*6 vuorokauden inkubointi

	Näytettä ei otettu kyseisestä pisteestä
	Ei kasvustoa
	Kasvustoa alle puolet maljasta
	Kasvustoa yli puolet maljasta

K = kesäkuu
H = heinäkuu
E = elokuu

Näytteenottoalueelta B (Kuva 14, s. 28) ei löytynyt kesän aikana *E. coli*. Muiden mikrobien määrä vaihteli. Kesäkuun koliformitulosten perusteella heinäkuun ja elokuun näytteenotot kohdistettiin näytteenottohanaan. Koliformien ja aerobisten kokonaisbakteerien määrä olikin runsasta joka kuukausi näytteenottohanan sisäpuolella. Todennäköinen syy tälle voi olla se, että näytteenottohana ei ollut ns. aseptinen näytteenottohana. Laitokselta ilmoitettiin näytteenoton aikaan, että hana on tarkoitus vaihtaa aseptiseen versioon. (Taulukko 7, s. 31.)

Taulukko 7. Pintasivelynäytteiden tulokset näytteenottoalueelta B (Kuva 14, s. 28)

	Koliformit			<i>E. coli</i>			Aerobiset kokonaisbakteerit			Homeet ja hiivat		
	K	H	E	K	H	E	K*	H	E	K*	H	E
B (kontti, sisä)												
Näytteenottohanan kahva												
Näytteenottohanan sisäpuoli												
Näytteenottohanan ulkopuoli												
Jäteastian sisäpuoli, lähellä vesirajaa												
Jäteastiassa oleva rejektivesi												
Ulkoilmapuhaltimen ritilä, lähinnä ovea												
Ulkoilmapuhaltimen ritilä, kauimpana ovesta												
Siniset kahvat seinässä												
Sinisen pumpun ritilä 1. säiliön kohdalla												
Sinisen lämmittimen ritilä												
Lattiataso 1. säiliön kohdalla												
1. säiliön kohdalla olevan pumpun osa												

*6 vuorokauden inkubointi

	Näytettä ei otettu kyseisestä pisteestä
	Ei kasvustoa
	Kasvustoa alle puolet maljasta
	Kasvustoa yli puolet maljasta

K = kesäkuu
H = heinäkuu
E = elokuu

Näytteenottoalueelta C (Kuva 14, s. 28) löytyi heinäkuussa *E. coli*. *E. coli* -kasvuston määrä oli kyseisten näytteiden maljoilla vähäistä mutta koliformien määrä oli runsasta. Suurin huomio näytteiden tulosten perusteella keskittyi kuormausletkuun, sen säilytystelineeseen tai -koteloon sekä kuormausletkun ja kuormauksen hanan välikappaleeseen. Näitä elementtejä ei pestä jokaisella kuormanhakukerralla ja varsinkin talvella vedellä peseminen olisi haasteellista tai jopa mahdotonta jäätymisen vuoksi. Heinäkuun *E. coli* -havainnon johdosta kuormausyksikölle ja -letkulle sekä sen telineelle tehtiin runsas vesihuuhtelu. Tämä ehkä johti siihen, että elokuun näytteet olivat puhtaampia. On kuitenkin harmillista, että heinäkuussa *E. coli* -havaintopisteistä ei otettu näytteitä ennen kuormaustapahtumaa. Tällöin jäi epäselväksi se, oliko letkussa ja välikappaleessa *E. coli* jo ennen kuormausta. On huomionarvoista, että letkua säilytetään telineessä aina siten, että autoon kiinnitettävä pääty on telineen ylemmässä päässä. Tällöin autossa kiinni olleesta päästä voi valua rejektivettä letkun toiseen pätyyn, josta seuraavalla kuormauksella letkun pätyyn kuivunut rejektivesi pääsee kosketuksiin välikappaleen kanssa. Asia on hyvä ottaa huomioon laajempaa pohdintaa tehdessä. (Taulukko 8, s. 32.)

Taulukko 8. Pintasivelynäytteiden tulokset näytteenottoalueelta C (Kuva 14, s. 28) ennen kuormausta ja kuormauksen jälkeen

	Koliformit			<i>E. coli</i>			Aerobiset kokonaisbakteerit			Homeet ja hiivat		
C (kontti, ulko ennen kuormausta)	K	H	E	K	H	E	K*	H	E	K*	H	E
Letkun autonpuoleisen pään sisäpuoli												
Letkun autonpuoleisen pään ulkopuoli												
Letkun valupäädyn sisäpuoli												
Letkun kotelon valupäädyn sisäpuoli												
Kuormausyksikön luukun sisäpuoli												
Kuormausyksikön luukun ulkopuoli												
Kuormausyksikön seinä												
Kuormausyksikön alataso												
Paineilmayhteen sisäpuoli												
Paineilmayhteen ulkopuoli												
Kuormausyksikön sininen kahva												
Kuormausyksikön putken sisäpuoli												
Kuormausyksikön putken ulkopuoli												
Kuormausyksikön putken suojus												
Putken ja letkun välikappaleen sisäpuoli												
Putken ja letkun välikappaleen kumitiivisteiden sisäpuoli												
Kuormausyksikön etanolisuihkepullo												
Sähkökaapin lastauskatkaisin												
C (kontti, ulko kuormauksen jälkeen)	K	H	E	K	H	E	K*	H	E			
Letkun autonpuoleisen pään sisäpuoli												
Letkun autonpuoleisen pään ulkopuoli												
Letkun valupäädyn sisäpuoli												
Letkun valupäädyn sisäpuoli vesihuuhtelun jälkeen												
Paineilmayhteen sisäpuoli												
Paineilmayhteen ulkopuoli												
Kuormausyksikön sininen kahva												
Putken ja letkun välikappaleen sisäpuoli												
Putken ja letkun välikappale vesi- ja etanolisuihkun jälkeen												

*6 vuorokauden inkubointi

	Näytettä ei otettu kyseisestä pisteestä
	Ei kasvustoa
	Kasvustoa alle puolet maljasta
	Kasvustoa yli puolet maljasta
	<i>E. coli</i> -kasvustoa

K = kesäkuu
H = heinäkuu
E = elokuu

Näytteenottoalueelta D (Kuva 14, s. 28) ei löytynyt kesän aikana *E. colia*. Koliformien määräkin oli keskimäärin vähäistä. Aerobisten kokonaisbakteerien määrä vaihteli runsaasta vähäiseen ja homeita ja hiivoja oli runsaasti. Kuormauksella ei tulosten perusteella näyttänyt olevan vaikutusta mikrobien lisääntymiseen korvausilmaputkissa. Tosin kuormauksen jälkeiset näytteet otettiin välittömästi kuormauksen jälkeen, jolloin putkiin mahdollisesti kulkeutuneet mikrobit eivät ehtineet lisääntymään ainakaan niin paljoa, että se näkyisi näytteiden tuloksissa. (Taulukko 9.)

Taulukko 9. Pintasivelynäytteiden tulokset näytteenottoalueelta D (Kuva 14, s. 28) ennen kuormausta ja kuormauksen jälkeen

	Koliformit			<i>E. coli</i>			Aerobiset kokonaisbakteerit			Homeet ja hiivat		
	K	H	E	K	H	E	K	H	E	K	H	E
D (rejektivesisäiliöiden korvausilmaputket ennen kuormausta)												
1. putki, sisäpuoli												
1. putki, ulkopuoli												
2. putki, sisäpuoli												
2. putki, ulkopuoli												
D (rejektivesisäiliöiden korvausilmaputket kuormauksen jälkeen)												
1. putki, sisäpuoli												
1. putki, ulkopuoli												
2. putki, sisäpuoli												
2. putki, ulkopuoli												
1. putki, pääty												
2. putki, pääty												

	Näytettä ei otettu kyseisestä pisteestä
	Ei kasvustoa
	Kasvustoa alle puolet maljasta
	Kasvustoa yli puolet maljasta

K = kesäkuu
H = heinäkuu
E = elokuu

Näytteenottoalueelta E (Kuva 14, s. 28) eli kuormaavasta autosta löytyi kesä- ja heinäkuussa *E. colia*. Elokuussa *E. colia* ei löytynyt. Kuormaava auto oli joka kuukausi eri. Elokuun näytteenotossa ollut auto oli juuri hiljattain pesty, mikä saattoi olla syynä elokuun puhtaampiin tuloksiin. *E. coli*-havainnot tehtiin auton säiliön korvausilmaputken ympäristöstä. Tällöin on todennäköistä, että myös auton säiliön sisällä oli *E. colia*. Rejektivesikuormia hakevat autot kuljettavat samalla kalustolla myös muiden yritysten tuottamaa rejektivesilannoitetta, jolloin *E. colin* alkuperäistä lähdettä on vaikea selvittää. Kuormauskaluston puhtaanapito on kuljetusyrityksen vastuulla, jolloin yritysten välisen yhteistyön tärkeys korostuu taudinaiheuttajien ehkäisyssä. (Taulukko 10, s. 34.)

Taulukko 10. Pintasivelynäytteiden tulokset näytteenottoalueelta E (Kuva 14, s. 28).

	Koliformit			<i>E. coli</i>			Aerobiset kokonaisbakteerit		
	K	H	E	K	H	E	K	H	E
E (rejektivesikuormaa hakeva auto)									
Korvausilmaputki, sisäpuoli									
Korvausilmaputki, ulkopuoli									
Korvausilmaputken alapuolella oleva kouru									
Katolta tulevan putken sisäpuoli									
Sivukourussa oleva letkun välikappale (ei käytössä)									
Kuljettajan puoleisen oven kahva									
Letkun ja auton kiinnikekohdan ulkopuoli									
Letkun kiinnikekohdan ympäristö autossa									
Letkun kiinnikekohdan suojus kuormauksen jälkeen									
Letkun kiinnike									
Takarenkaiden roiskesuoja									
Takarekisterikilven yläosa									
Autosta maahan pudonnutta lannoitetuotetta									

	Näytettä ei otettu kyseisestä pisteestä
	Ei kasvustoa
	Kasvustoa alle puolet maljasta
	Kasvustoa yli puolet maljasta
	<i>E. coli</i> -kasvustoa

K = kesäkuu
H = heinäkuu
E = elokuu

10.2 Nestenäytteiden tulokset

Nestenäytteitä otettiin kesän aikana näytteenottoalueelta A eli MVR:ltä lähtevän linjan näytteenottohanasta, alueelta B eli varastosäiliöiden näytteenottohanasta ja alueelta C eli kuormausyksikön hanasta (Kuva 14, s. 28). Heinäkuussa otettiin nestenäyte vain alueelta C. Näytteistä analysoitiin koliformit ja *E. coli*, aerobiset kokonaisbakteerit sekä homeet ja hiivat. Alustoina käytettiin vaihtelevasti elatusaineita ja petrifilmejä.

Suurin osa kesäkuun näytteiden tuloksista asettui joidenkin pitoisuuksien (pmy/ml) välille, koska pesäkkeiden määriä maljoilta tai filmeiltä ei laskettu täydellä tarkkuudella. Joidenkin maljojen tai filmien pesäkkeitä ei edes pystynyt laskemaan hyvällä tarkkuudella levinneiden pesäkkeiden tai mikrobien kaasun muodostuksen vuoksi. Homeita ja hiivoja oli myös vaikea erottaa toisistaan joissakin tapauksissa, jolloin joko laskettiin niiden yhteistulos tai kummankin likimääräiset arvot. Heinäkuun näytteessä hiivoja oli hyvin runsaasti, joten tarkkaa tulosta pitoisuudesta ei saatu.

Kuitenkin kaikista tuloksista pääsi hyvin selville siitä, millaisissa suuruusluokissa mikrobipitoisuudet olivat kesän nestenäytteissä.

E. coli löytyi kesän aikana vain heinäkuun näytteestä. Pitoisuus oli 382 pmy/ml, mikä jää lannoitevalmisteasetuksen enimmäisrajan (1 000 pmy/ml) alapuolelle. Kuitenkin tämän tuloksen sekä heinäkuun pintanäytteiden *E. coli* -löydösten johdosta laitoksella tehtiin ylimääräisiä pesuja, jotta tilannetta saatiin parannettua. Elokuussa alueelta C (Kuva 14, s. 28) otetun nestenäytteen mikrobipitoisuudet olivatkin selvästi pienempiä kuin kesä- ja heinäkuussa. (Taulukko 11.)

Taulukko 11. Kolmelta näytteenottoalueelta kesällä 2017 otettujen nestenäytteiden mikrobimäärät (pmy/ml)

Mikrobi	A (MVR:ltä lähtevä linja)			B (kontti, sisä)			C (kontti, ulko)		
	Kesäkuu	Heinäkuu	Elokuu	Kesäkuu	¹⁾ Heinäkuu	Elokuu	Kesäkuu	Heinäkuu	Elokuu
Koliformit (Chromocult)	$< 1,0 \times 10^0$	-	$< 1,0 \times 10^0$	$3,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$3,1 \times 10^4$	²⁾ $1,3 \times 10^8$	$< 1,0 \times 10^0$
Koliformit (EC)	$< 1,0 \times 10^0$	-	-	$0,8-1,0 \times 10^3$	-	-	$0,3-1,0 \times 10^5$	-	-
<i>E. coli</i> (Chromocult)	$< 1,0 \times 10^0$	-	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	-	$< 1,0 \times 10^0$	$< 1,0 \times 10^0$	$3,8 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^0$
<i>E. coli</i> (EC)	$< 1,0 \times 10^0$	-	-	$< 1,0 \times 10^0$	-	-	$< 1,0 \times 10^0$	-	-
<i>E. coli</i> (SEC)	$< 1,0 \times 10^0$	-	-	$< 1,0 \times 10^0$	-	-	$< 1,0 \times 10^0$	-	-
Aerobiset kokonaisbakteerit (AC)	³⁾ $0,3-1,0 \times 10^4$	-	$4,9 \times 10^3$	³⁾ $0,7-1,0 \times 10^4$	-	$9,7 \times 10^3$	³⁾ $0,7-1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^3$
Hiivat (2 % mallasuute)	-	-	⁴⁾ $1,0 \times 10^1$	-	-	⁴⁾ $4,7 \times 10^2$	-	$> 1,0 \times 10^5$	⁴⁾ $0,1-1,0 \times 10^2$
Hiivat (YM)	$< 1,0 \times 10^0$	-	-	$0,8-1,0 \times 10^3$	-	-	$2,8 \times 10^3$	-	-
Homeet (YM)		-	-		-	-		-	-
Homeet (2 % mallasuute)	-	-	⁴⁾ $1,0 \times 10^1$	-	-	⁴⁾ $< 1,0 \times 10^2$	-	$5,4 \times 10^4$	⁴⁾ $0,1-3,0 \times 10^2$

¹⁾ Viikkonäyte 19.7.

²⁾ 24 h inkubointi

³⁾ Inkubointi 37 asteessa

⁴⁾ 3 vrk inkubointi

10.3 Ilmanäytteiden tulokset

Ilmanäytteitä kerättiin valmiiksi valetuille maljoille (Chromocult, THG ja 2 % mallasuuteagar) varastosäiliökontin katolla sijaitsevien säiliöiden korvausilmaputkien välittömässä läheisyydessä alueella D (Kuva 14, s. 28). Näytteitä kerättiin ennen kuormaustapahtumaa ja kuormaustapahtuman aikana. Näytteenottoaika oli 10 minuuttia paitsi elokuun 2 %

mallasuuteagarmaljoille 5 minuuttia, koska heinäkuussa huomattiin näiden maljojen kasvavan umpeen ennen inkubointiajan päättymistä.

Ilmanäytteiden tarkoituksena oli selvittää, voisiko kuormaavan auton säiliön korvausilmaputkesta levitä mikrobeja ympäristöön niin merkittävästi, että se aiheuttaisi rejektiveden kontaminoitumisen varastosäiliöiden korvausilmaputkien kautta. Tosin ulkona tuulen nopeus ja suunta vaihtelivat näytteenottohetkien aikana hyvinkin satunnaisesti, jolloin mahdollinen riski jäisi todellisuudessa huomaamatta. Ennen näytteenottoa olevilla saateilla ja ilmankosteudella voi olla vaikutusta tuloksiin. Myös laitoksella tapahtuva muu toiminta voi vaikuttaa tuloksiin. Etenkin elokuussa ennen kuormaustapahtumaa otettujen näytteiden aikana laitoksella kuormattiin ja kuljetettiin biokaasuprosessin poisteesta separoitua kuivajaetta, jota todennäköisesti pöllysi ilmaan jonkin verran. Tämä saattoi nostaa ilman mikrobipitoisuuksia hetkellisesti.

E. coli ja koliformeja ei esiintynyt kesän ilmanäytteissä ollenkaan. Aero-bisten kokonaisbakteerien määrä oli vaihtelevaa muttei silti kovinkaan runsasta. Sosiaali- ja terveysministeriön asumisterveysohjeessa (2003, 81) on ilmoitettu asuinrakennusten sisäilman kohonneen bakteeripitoisuuden alkavan vasta 4500 pmy/m³. Tosin ulko- ja sisäilman mikrobipitoisuuksia on tässä tapauksessa vaikea rinnastaa keskenään, kun on kyse kontaminaatoriskien selvittämisestä eikä terveysriskien arvioimisesta. Homeiden ja hiivojen määrä ei ollut erityisen runsasta rejektiveden kontaminoitumisen kannalta. Ilmanäytteiden tuloksista voitiin tehdä päätelmä siitä, että kuormaustapahtumalla ei ollut juurikaan merkitystä rejektiveden kontaminoitumisen kannalta ilman välityksellä vaihtelevista sääolosuhteista huolimatta. Mikrobipitoisuudet olivat suurempia elokuussa kuin kesäkuussa, mikä tukee teoriaa kesän vaikutuksesta kontaminaatoriskien kasvamiseen yleisesti. (Taulukko 12.)

Taulukko 12. Kesän ilmanäytteiden tulokset ennen rejektiveden kuormausta ja kuormauksen aikana (pmy/m³)

Mikrobi	Kesäkuu		Heinäkuu		Elokuu	
	Ennen	Aikana	Ennen	Aikana	Ennen	Aikana
Koliformit	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0
Aerobiset kokonaisbakteerit	233	837	484	311	1 979	42
Homeet ja hiivat	-	-	2 053	1 346	4 820	2 466

10.4 Viikkonäytteiden ja muiden näytteiden tulokset

Viikkonäytteitä toimitettiin laboratorioon viikoittain 19.7.–22.8.2017. Näytteet otettiin näytteenottoalueen B (Kuva 14, s. 28) näytteenottohanasta. Näytteitä kertyi kaikkiaan kuudelta viikolta, ja niistä analysoitiin *E. coli* ja koliformit (Chromocult) sekä kolmesta viimeisestä näytteestä aerobiset kokonaisbakteerit (petrifilmi AC). Koliformien määrä oli 19.7. otetussa näytteessä suuri (10 879 pmy/ml). Näyte otettiin samalla viikolla, kun oli heinäkuun näytteenottokierros. Silloin kuormausletkun kautta otetussa nestenäytteessä oli koliformeja 126 miljoonaa pmy/ml ja *E. coli*kin 300 pmy/ml. Näiden tulosten perusteella laitoksella suoritettiin omavalvonnan ylittäviä pesuja. Pesujen vaikutus näkyi seuraavan viikon (25.7.) otetussa näytteessä, jolloin koliformeja oli enää vain 34 pmy/ml. Kuitenkin koliformien määrä nousi jälleen ja 8.8. otetussa näytteessä koliformeja oli pyöristettynä 30 000 pmy/ml. Tämä oli suurin koliformipitoisuus, mitä näytteenottoalueelta B (Kuva 14, s. 28) otetuissa nestenäytteissä havaittiin koko kesän aikana. Aerobisten kokonaisbakteerien määräkin oli koliformeihin verrattuna yli kaksinkertainen, 68 000 pmy/ml. 9.–11.8. välisenä aikana MVR:llä tehtiin huoltotoimenpiteitä, jonka päälle suoritettiin pesuja. Tämän johdosta laboratorioon toimitettiin samalla viikolla kaksi ylimääräistä näytettä analysoitavaksi. Kahden seuraavan viikon nestenäytteissä koliformien ja aerobisten kokonaisbakteerien määrä oli laskenut selvästi, jolloin voitiin todeta huoltotoimenpiteiden jälkeen tehtyjen pesujen olleen onnistuneita. (Taulukko 13.)

Taulukko 13. Viikkonäytteiden tulokset (pmy/ml)

Päivämäärä	Koliformit	<i>E. coli</i>	Aerobiset kokonaisbakteerit
19.7.2017	10 879	0	-
25.7.2017	34	0	-
1.8.2017	2 239	0	-
8.8.2017	*30 000	0	68 018
15.8.2017	303	0	11 622
22.8.2017	186	0	6 366

*pyöristetty tulos

Pesujen jälkeen laboratorioon toimitettiin kaksi ylimääräistä nestenäytettä, joista toinen oli otettu MVR:n syöttösäiliöstä 10.8. ja toinen MVR:ltä lähtevän linjan näytteenottohanasta 11.8. alueelta A (Kuva 14, s. 28). Syöttösäiliön näyte oli sekoitus pesuaineita, putkista irronnutta sakkaa ja rejektivettä. Tässä näytteessä *E. coli*a ja koliformeja ei ollut yhtään ja aerobisten kokonaisbakteerien määräkin oli vain 1 036 pmy/ml. Näytteenottohanasta otetussa näytteessä ei ollut *E. coli*a mutta koliformeja ja aerobisia kokonaisbakteereja oli runsaasti. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että näytteenottohana oli jouduttu purkamaan huoltotoimenpiteiden ja pesujen yhteydessä, jolloin putkeen oli päässyt kulkeutumaan mikrobeja.

Koliformipitoisuus laski kuitenkin 15.8. otetussa näytteessä nolleen ja aerobisten kokonaisbakteeripitoisuuskin oli pieni. (Taulukko 14.)

Taulukko 14. Ylimääräisten nestenäytteiden tulokset (pmy/ml)

Näyte	Koliformit	<i>E. coli</i>	Aerobiset kokonaisbakteerit
10.8.2017 (MVR:n syöttösäiliö)	0	0	1 036
11.8.2017 (MVR:ltä lähtevän linjan näytteenottohana)	22 823	0	69 429

11 TULOKSET – ENSURE-LUMINOMETRIN JA MICROSNAP *E. COLI* -TESTIN SOVELTUVUUS REJEKTIVEDELLE

EnSURE-luminometrille ja MicroSnap *E. coli* -testille suoritetuista kolmesta kokeesta kaksi jälkimmäistä osoittautuivat tuloksiltaan merkityksellisimmiksi, joten niiden tulokset on esitetty tarkemmin tässä luvussa. Ensimmäisen kokeen tulokset on esitetty kootusti liitteessä 1.

Luminometri ilmoitti tulokset RLU-arvoina, jotka muunnettiin pmy/ml -arvoiksi MicroSnap Coliform & *E. coli* -menetelmäohjeessa (2014) olleen taulukon avulla (Taulukko 15).

Taulukko 15. RLU-arvojen muuntaminen *E. coli* -pitoisuuksiksi (Hygiena 2014.)

EnSURE-luminometrin ilmoittama arvo (RLU)	RLU-arvoa vastaava <i>E. coli</i> -pitoisuus (pmy/ml)
< 2	< 10
< 4	< 20
< 7	< 50
< 12	< 100
< 20	< 200
< 35	< 500
< 60	< 1 000
< 180	< 5 000
< 300	< 10 000

11.1 Toinen koe

Toisessa luminometrille tehdyssä kokeessa testattiin, miten rejektiveden laimentaminen vedellä vaikuttaa MicroSnap-testistä saataviin tuloksiin.

E. coli -sarjasta tehtiin viljelyt Chromocult-alustalle sekä SEC-petrifilmeille. Tavoitteena oli saada *E. coli* -sarjan nollaputkeen $1,5 \times 10^8$ pmy/ml oleva solususpensio. Viljelyiden tulosten perusteella tässä onnistuttiin melko hyvin, koska SEC-petrifilmeiltä saatu tulos oli $1,8 \times 10^8$ pmy/ml ja Chromocult-maljoilta $0,7 \times 10^8$ pmy/ml. Tosin Chromocult-maljojen inkubointiaika oli vain 24 tuntia, joten petrifilmeiltä saatua tulosta voitiin pitää luotettavana. (Taulukko 16.)

Taulukko 16. *E. coli* -sarjan nollaputken saavutettu *E. coli* -pitoisuus

Alusta	<i>E. coli</i> -pitoisuus nollaputkessa (pmy/ml)
Petrifilmi SEC	177 477 477
Chromocult ES*	72 727 273

*24 tunnin inkubointi

E. coli -sarjan kaikille putkille tehtiin suoraan detektiopuikot ilman rikastusvaihetta, ja tulokset luettiin luminometrilla (Taulukko 17, s. 40). Tulosten perusteella valittiin pitoisuudet $1,8 \times 10^8$ pmy/ml ja $1,8 \times 10^7$ pmy/ml, joista tehtiin MicroSnap-testi kokonaisuudessaan 6 tunnin inkubointiajalla. Samoilla pitoisuuksilla myös ympättiin rejektivettä. Kuitenkin kokeen päättyessä tai viimeistään tulosten valmistuessa ymmärrettiin, että ympiksi olisi kannattanut valita *E. coli* -sarjasta jotkin pienemmät pitoisuudet. Luminometri pystyy ilmoittamaan tuloksia aina 10 000 RLU-arvoon asti, mutta MicroSnap Coliform & *E. coli* -menetelmäohjeessa (2014) 300 RLU:ta on se maksimiarvo, joka pystytään vielä muuntamaan *E. coli* -pitoisuudeksi. Näitä suurempia RLU-arvoja on enää vaikea, ellei jopa mahdoton muuntaa tarkoiksi, niitä vastaaviksi *E. coli* -pitoisuuksiksi tämän menetelmän puitteissa.

Taulukko 17. Toteutuneet *E. coli* -sarjan pitoisuudet ja luminometrin ilmoittamat tulokset *E. coli* -sarjalle MicroSnap *E. coli* -testistä

Laimennos	Toteutunut <i>E. coli</i> - pitoisuus (pmy/ml)	Suora detektio (RLU)	Rikastus (t= 6h) ja detektio (RLU)
0	$1,8 \times 10^8$	234	843
-1	$1,8 \times 10^7$	45	1565
-2	$1,8 \times 10^6$	8	-
-3	$1,8 \times 10^5$	3	-
-4	$1,8 \times 10^4$	3	-
-5	$1,8 \times 10^3$	1	-
-6	$1,8 \times 10^2$	0	-
-7	$1,8 \times 10^1$	0	-
-8	$1,8 \times 10^0$	0	-
-9	$1,8 \times 10^{-1}$	3	-

Ensimmäistä rejektivesisarjaa ympättiin *E. coli* -sarjan pitoisuudella $1,8 \times 10^8$ pmy/ml. Ymppäystä tehdessä tapahtui 10-kertainen laimeneminen, jolloin ympätyn rejektivesisarjan tulosten tuli teoriassa olla linjassa *E. coli* -sarjan pitoisuuden $1,8 \times 10^7$ pmy/ml kanssa. Taulukossa 18 sivulla 41 on esitetty tämän ensimmäisen ympätyn rejektivesisarjan tulokset ja taulukon alareunaan on merkitty sulkuihin luminometrin antamat tulokset *E. coli* -sarjan pitoisuudelle $1,8 \times 10^7$ pmy/ml. Nämä tulokset näkyvät myös taulukossa 17.

Rejektivesi jota oli laimennettu vedellä 1:10, erottui negatiivisesti muista rejektivesilaimennoksista suorasta detektiosta saaduissa tuloksissa. Kuitenkaan mikään rejektivesilaimennos ei saavuttanut samaa suoran detektion tulosta kuin *E. coli* -sarjan pitoisuus $1,8 \times 10^7$ pmy/ml. Rikastuksen läpikäyneistä näytteistä rejektivesilaimennokset 1:10 ja 1:30 erottuivat negatiivisesti muiden laimennosten tuloksista. Rejektivesilaimennoksella 1:90 (1 219 RLU) päästiin jo melko lähelle teoriassa tavoiteltavaa arvoa (1 565 RLU). Kuitenkin kolmen laimeimman rejektivesilaimennoksen kohdalla liikuttiin jo yli MicroSnap Coliform & *E. coli* -menetelmäohjeen (2014) maksimiarvon ylittäneissä RLU-arvoissa. (Taulukko 18, s. 41.)

Taulukko 18. Ensimmäisen ympätyn rejektivesisarjan tulokset luminometrille tavoitteena *E. coli* -sarjan pitoisuudesta $1,8 \times 10^7$ pmy/ml saadut tulokset

Rejektiveden vesilaimennos	Suora detektio (RLU)	Rikastus (t = 6h) ja detektio (RLU)
1:10	11	92
1:30	20	81
1:60	20	921
1:90	25	1 219
1:1000	29	759

(*E. coli* -sarja 45 RLU)

(*E. coli* -sarja 1 565 RLU)

Toista rejektivesisarjaa ympättiin *E. coli* -sarjan pitoisuudella $1,8 \times 10^7$ pmy/ml. Ymppäystä tehdessä tapahtui 10-kertainen laimeneminen, jolloin ympätyn rejektivesisarjan tulosten tuli teoriassa olla linjassa *E. coli* -sarjan pitoisuuden $1,8 \times 10^6$ pmy/ml kanssa. Taulukossa 19 on esitetty tämän ensimmäisen ympätyn rejektivesisarjan tulokset ja taulukon alareunaan on merkitty sulkuihin luminometrin antamat tulokset *E. coli* -sarjan pitoisuudelle $1,8 \times 10^6$ pmy/ml. Nämä tulokset näkyvät myös taulukossa 17 sivulla 40. *E. coli* -sarjan pitoisuudesta $1,8 \times 10^6$ pmy/ml oli tehty kuitenkin vain suora detektio, jolloin rikastusvaiheen läpikäyneitä rejektivesisarjan näytteiden tuloksia ei pystynyt vertailemaan *E. coli* -sarjan rikastettujen näytteiden tulosten kanssa. Kuitenkin rikastuksen läpikäyneestä rejektivesisilaimennoksesta 1:30 saatu tulos oli sen verran korkea (1 088 RLU), että se herätti positiivisia ajatuksia testin ja luminometrin toimivuudesta kyseiselle rejektiveden laimennussuhteelle. Toisaalta tulosten suuri hajonta jäi mietityttämään. (Taulukko 19.)

Taulukko 19. Toisen ympätyn rejektivesisarjan tulokset luminometrille tavoitteena *E. coli* -sarjan pitoisuudesta $1,8 \times 10^6$ pmy/ml saadut tulokset

Rejektiveden vesilaimennos	Suora detektio (RLU)	Rikastus (t = 6h) ja detektio (RLU)
1:10	0	33
1:30	0	1 088
1:60	0	459
1:90	0	275
1:1000	3	1 723

(*E. coli* -sarja 8 RLU)

(-)

11.2 Kolmas koe

Kolmas koe oli samankaltainen kuin toinen koe. Kolmannessa kokeessa tehtiin jälleen vedellä laimennettu rejektivesisarja, jossa laimennoksia oli tällä kertaa vain kaksi, 1:30 ja 1:90. Kolmanneksi putkeksi sarjoihin lisättiin pelkkää vettä sisältänyt näyte. Laimennusvesi ja vesinäyte olivat steriloitua hanavettä.

E. coli -sarjasta tehtiin maljaviljelyt Plate Count Agarille. Tavoitteena oli saada jälleen nollaputkeen $1,5 \times 10^8$ pmy/ml oleva solususpensio. Viljelyn tulosten perusteella nollaputken *E. coli* -pitoisuudesta tuli noin kolminkertainen tavoiteltuun: $4,9 \times 10^8$ pmy/ml. Taulukossa 20 on esitetty tämä saavutettu nollaputken *E. coli* -pitoisuus laimennoksen 0 kohdalla ja tämän tuloksen perusteella laskettiin sarjan muiden laimennosten *E. coli* -pitoisuudet. *E. coli* -sarjasta ei tehty MicroSnap-testiä. *E. coli* -sarjasta valittiin kaksi putkea, pitoisuuksiltaan $4,9 \times 10^4$ pmy/ml (laimennos -4) ja $4,9 \times 10^3$ pmy/ml (laimennos -5), joilla ympättiin kahta rejektivesilaimennossarjaa ja vesinäytettä.

Taulukko 20. Toteutunut *E. coli* -sarjan nollaputken pitoisuus ja sen perusteella lasketut muiden putkien pitoisuudet

Laimennos	<i>E. coli</i> -pitoisuus (pmy/ml)
0	490 909 091
-1	$4,9 \times 10^7$
-2	$4,9 \times 10^6$
-3	$4,9 \times 10^5$
-4	$4,9 \times 10^4$
-5	$4,9 \times 10^3$
-6	$4,9 \times 10^2$
-7	$4,9 \times 10^1$
-8	$4,9 \times 10^0$

Ensimmäistä rejektivesisarjaa ympättiin *E. coli* -sarjan pitoisuudella $4,9 \times 10^4$ pmy/ml. Ymppäystä tehdessä tapahtui 10-kertainen laimeneminen, jolloin ympätyn rejektivesisarjan tulosten tuli teoriassa olla linjassa *E. coli* -sarjan pitoisuuden $4,9 \times 10^3$ (4 900) pmy/ml kanssa. Ympätyn rejektivesisarjan tuloksista lähimmäksi tätä arvoa pääsi ympätty vesi, jonka RLU-arvo 109 muunnettuna *E. coli* -pitoisuudeksi oli 1 000–5 000 pmy/ml. Ymppäystä vesinäytteestä tehtiin maljaviljelyt, joiden perusteella voitiin sanoa ympäyksen olleen onnistunut, koska tulosten perusteella ympätyssä vedessä *E. coli* -pitoisuus oli 4 800 pmy/ml (ilmoitettu taulukon 21 alareunassa sivulla 43). Tämän vuoksi oli erikoista, että rejektivesilaimennoksista 1:30 ja 1:90 saatiin suuremmat tulokset mitä tavoiteltiin. Tulokset olivat myös juuri tästä syystä ristiriidassa toisen kokeen tulosten kanssa. (Taulukko 21, s. 43.)

Rikastuksen läpikäyneiden puikkojen liemistä tehtiin laimennossarjat ja maljaviljelyt PCA:lle, joiden mukaan rejektivesilaimennos 1:90 sisälsi lähes kaksinkertaisesti mikrobeja kuin pelkkä vesinäyte. Tämä voi osin selittyä sillä, että rejektivesinäyte itsessään ei ollut steriiliä, jolloin maljoilla kasvoi muitakin mikrobeja kuin *E. coli*. Tällöin ei päästy täyteen varmuuteen siitä, mikä rikastusliemen todellinen *E. coli* -pitoisuus oli. Toisaalta luminometrin antama korkea RLU-arvo osoitti sen, että suurin osa laimennoksen 1:90 mikrobeista olisi *E. coli*. Rikastusliemien maljaviljelytulokset on ilmoitettu taulukon 21 alareunassa.

Taulukko 21. Ensimmäisen ympätyn rejektivesisarjan tulokset tavoitteena *E. coli* -pitoisuus $4,9 \times 10^3$ pmy/ml

Rejektiveden vesilaimennos	Rikastus (t = 0 h) ja de- tektio (RLU)	Rikastus (t = 6 h) ja de- tektio (RLU)
1:30	1	732
1:90	0	²⁾ 417
¹⁾ Vesi	0	³⁾ 109

¹⁾ 4 818 pmy/ml

²⁾ $1,3 \times 10^8$ pmy/ml

³⁾ $0,7 \times 10^8$ pmy/ml

Toista rejektivesisarjaa ympättiin *E. coli* -sarjan pitoisuudella $4,9 \times 10^3$ pmy/ml. Ymppäystä tehdessä tapahtui 10-kertainen laimeneminen, jolloin ympätyn rejektivesisarjan tulosten tuli teoriassa olla linjassa *E. coli* -sarjan pitoisuuden $4,9 \times 10^2$ (490) pmy/ml. kanssa. Ympätyn rejektivesisarjan tuloksista lähimmäksi tätä arvoa pääsi rejektivesilaimennos 1:30, jonka RLU-arvo 17 muunnettuna *E. coli* -pitoisuudeksi oli 100–200 pmy/ml. Tämän sarjan tulokset olivat siinä mielessä yhteneväiset ensimmäisen sarjan tulosten kanssa, että väkevin rejektivesilaimennos antoi suuremman tuloksen kuin pelkkä vesinäyte. Toisaalta rikastuksen läpikäyneen vesinäytteen ja laimennoksen 1:90 RLU-tuloksissa ei ole käytännössä ollenkaan eroa. (Taulukko 22.)

Taulukko 22. Toisen ympätyn rejektivesisarjan tulokset tavoitteena *E. coli* -pitoisuus $4,9 \times 10^2$ pmy/ml

Rejektiveden vesilaimennos	Rikastus (t = 0h) ja de- tektio (RLU)	Rikastus (t = 6h) ja de- tektio (RLU)
1:30	0	17
1:90	0	1
Vesi	0	0

12 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Opinnäytetyö sisälsi kaksi toisistaan riippumatonta selvitystä ja käytännön työtä, joten niiden johtopäätökset ja pohdinnat on esitetty omissa luvuissaan.

12.1 Rejektiveden kontaminaatioreitit ja -syyt

Kesän 2017 aikana laitokselta kerättiin kolmenlaisia näytteitä, joiden perusteella pystyttiin pohtimaan ja arvioimaan rejektiveden kontaminaatioreittejä ja -syytä. Ilmanäytteiden tulosten perusteella voitiin todeta, että ilman välityksellä tapahtuva kontaminaatio on epätodennäköistä, vaikkakin teoriassa tämä voisi olla jossain määrin mahdollista (ks. luku 5). Huomio kannattaa kuitenkin kiinnittää varastosäiliöiden korvausilmaputkiin, joiden sisäpuolelle höyrystyy jonkin verran kosteutta kuumasta tai lämpimästä rejektivedestä. Höyryn mukana putkiin voi kulkeutua pieniä määriä mikrobeja, jotka ajan kuluessa voivat lisääntyä putkien pinnoilla huomattavastikin. Putkista otettujen pintasivelynäytteiden mukaan aerobisten kokonaisbakteerien määrä olikin suurimmassa osassa näytteistä runsasta läpi kesän. Mikrobien kulkeutuminen putkiin säiliöiden ulkopuolelta (ulkoilmasta) on epätodennäköistä etenkin, jos säiliöt voidaan ylipaineistaa ja putkien aukot ovat hyvin suojattuja ja suojusten puhtaudesta huolehditaan säännöllisesti.

Kesän nestenäytteiden tulosten perusteella voitiin todeta, että rejektiveden hygienisointi on onnistunutta ja rejektivesi on puhdasta varastosäiliöihin tullessa. Mikrobien määrä alkaa kasvaa rejektivedessä jossakin vaiheessa sen varastoinnin aikana. Todennäköisin syy kokonaismikrobipitoisuuden kasvuun on säiliön sisäpinnoille kertynyt biofilmi, joka antaa hyvän kasvualustan mikrobeille. Varsinainen ulkopuolinen kontaminaatio voi käytännössä tapahtua kolmen eri sisäänmenoaukon kautta: korvausilmaputkesta, näytteenottohanasta ja kuormausta varten tarkoitettusta hanasta. Korvausilmaputkista todettiin jo, että niiden kautta tapahtuva kontaminoituminen on epätodennäköistä eli korvausilmaputket voidaan poisulkea mahdollisena kontaminaatioreittinä.

Varastosäiliöiden näytteenottohanasta käytiin kesän aikana keskustelua laitoksen edustajien kanssa ja todettiin, että hana on tarkoitettu vaihtaa ns. aseptiseen näytteenottohanaan. Aseptisessä näytteenottohanassa ei ole samanlaisia avoimia pintoja kuin tavallisissa hanoissa, jolloin mikrobikasvustoa ei pääse kertymään putkeen juuri yhtään tai ei ollenkaan. Kesän aikana käytössä ollut näytteenottohana oli perinteisen mallinen hana, jossa oli avoin hanan suuaukko. Hanan sisäpuolelta otetuissa pintanäytteissä esiintyi paljon koliformeja ja aerobisia kokonaisbakteereja. *E. colia* ei kuitenkaan löydetty näytteenottohanasta eikä sen ympäristöstä varastosäiliöiden konttirakennuksen sisäpuolella. Jo kesäkuun pintasivelynäytteiden perusteella voitiin todeta, että näytteenottohana ja sen ympäristö

mahdollisena kontaminaatioreittinä voi olla epätodennäköinen, vaikka hanan sisäpuolella koliformien määrä olikin runsasta. Viimeistään aseptinen näytteenottohana voi estää rejektiveden kontaminoitumisen tämän reitin kautta.

Varastosäiliöiden kolmas sisäänmenoaukko, kuormausta varten tarkoitettu hana, osoittautui näytteiden tulosten perusteella todennäköisimmäksi rejektiveden kontaminaatioreitiksi. Heinäkuun näytteenotossa otetussa nestenäytteessä (kuormausletkun kautta otettu näyte) oli *E. colia*, tosin alle sallitun maksimiarvon. Näyte oli otettu kuormausletkun kautta eikä suoraan hanasta. Tämän lisäksi ainoat *E. coli* -löydökset kesän aikana tehtiin pintasivelynäytteistä alueilta C ja E (Kuva 14, s. 28): kesä- ja heinäkuussa kuormaavan auton säiliön korvausilmaputkesta ja sen ympäristöstä sekä heinäkuussa kuormausletkusta ja letkun ja hanan välikappaleesta. Letkusta ja välikappaleesta otettiin näytteet tosin kuormaamisen jälkeen, jolloin *E. colia* sisältänyttä rejektivettä päätyi pintasivelynäytteisiin. Kuitenkin heti seuraavana päivänä otetussa viikkonäytteessä ei ollut *E. colia* ja koliformienkin pitoisuus oli huomattavasti pienempi. Tästä herää varovainen johtopäätös, että kuormanhaun jälkeen säiliöihin tullut tuore rejektivesi saattoi olla tarpeeksi kuumaa *E. colin* tuhoutumiseen, mikä selittäisi puhtaammat tulokset. Jää kuitenkin epäselväksi, olisiko vain kuormausletkussa itsessään ollut *E. colia* niin paljon, että se olisi aiheuttanut nestenäytteessä todetun *E. coli* -pitoisuuden.

Heinäkuun *E. coli* -löydösten jälkeen kuormausyksikölle ja letkulle suoritettiin runsas vesihuuhtelu. Tällaisia huuhteluja olisi hyvä suorittaa varsinkin kesäaikaan usein, jotta etenkin kuormausletkuun ei pääsisi kertymään mikrobikasvustoa. Letkun säilytykseenkin tulisi kiinnittää erityistä huomiota. Letkua säilytettiin varastokontin seinässä olevassa telineessä, jossa on pieni kallistuskulma. Letkun autonpuoleista päätyä säilytettiin telineen ylemmällä tasolla, mikä voi olla isokin riski rejektiveden kontaminoitumista ajatellen, jos letkua ei huuhdella käytön jälkeen. Mahdollisesti saastuneesta autosta voi päästä taudinaiheuttajia letkuun, jolloin säilytettäessä letkua edellä mainitulla tavalla, taudinaiheuttajat voivat valua ja levitä helposti letkun koko pituudelle ja seuraavalla kuormauskerralla kulkeutua välikappaleen kautta hanan suuaukolle ja siitä säiliöön. Kuormausletkuun voi päästä myös pieneläimiäkin, joiden uloste voi saastuttaa letkun mutta laitokselta ei ole raportoitu tällaisista ongelmista. Lintujen uloste voisi myös olla mahdollinen kontaminaatoriski, mutta lintujen ulosteita ei erityisemmin havaittu varastosäiliökontin ympäristössä tai esimerkiksi kontin kahtalla.

Yhteenvedon voidaan todeta, että todennäköisin rejektiveden kontaminaatioreitti on kuormausletku ja kuormausyksikön kaappi, jossa säilytetään mm. letkun ja hanan välikappaletta. Todennäköisin rejektiveden kontaminaatiosyy tai -lähde on rejektivesikuormia hakevat autot. Kesällä on myös selvästi oma vaikutuksensa mikrobipitoisuuksien ja kontaminaatioriskien lisääntymiseen. Pitkään jatkunut lämmin sää ja kesän edetessä

ilmankosteuden kasvaminen (Ilmatieteen laitos n.d.) luovat hyvät olosuhteet mikrobien lisääntymiselle. Kaikenlaisia pesuja kannattaa kesällä siis tehostaa ja lisätä kesän edetessä ainakin syksyn alkuun asti. Tällä rejektiveden hygieeninen laatu voidaan taata jatkossakin. Laitoksella tehtiin myös jo kesän aikana muitakin hygieniata parantavia toimenpiteitä kaikkien näytteiden tulosten perusteella. Myös laitoksen ja kuormausyrityksen hyvällä yhteistyöllä voidaan taata rejektiveden hyvä laatu.

Työn tilaaja toivoi opinnäytetyöhön liitteeksi joitakin yleisiä ohjeistuksia mikrobiologisten näytteiden ottoon liittyen, mikä helpottaa esimerkiksi uusien työntekijöiden perehdyttämisessä (Liite 2). Tämän lisäksi hahmotettiin myös näytteenottoihin liittyen toimintasuunnitelmaa tilanteesta, jossa rejektivesi on kontaminoitunut. Suunnitelman avulla voidaan lähteä selvittämään kontaminaation alkuperää ja reittiä. (Liite 3.)

12.2 EnSURE-luminometrillä ja MicroSnap *E. coli* -testin soveltuvuus rejektivedelle

EnSURE-luminometrillä ja MicroSnap *E. coli* -testille suoritettiin kolme koea, joiden avulla selvitettiin menetelmän soveltuvuutta rejektiveden testaamiseen. Ennen kokeiden toteutusta rejektiveden pH:n säätöä selvitettiin, ja todettiin että rejektiveden pH:n säätö onnistui, joten ainakaan sillä ei ollut merkitystä menetelmän soveltuvuuden kannalta.

Ensimmäisessä kokeessa rejektivettä ei laimennettu ja *E. colilla* ympätyt rejektivesinäytteet näyttivät nollaa tai lähes nollaa luminometrillä sekä petrifilmeillä. Kuitenkin *E. coli* -sarjalle luminometri antoi oikeanlaisia tuloksia, kun verrattiin niitä maljaviljelyistä ja petrifilmeiltä saatuihin tuloksiin. Rejektiveden ympäyskin oli todennäköisesti onnistunut, joten heräsi epäily, että rejektiveden sameus oli syynä siihen, miksi luminometri ei antanut oikeanlaisia tai odotettuja tuloksia.

Toisessa kokeessa rejektiveden sameutta vähennettiin laimentamalla sitä RO-vedellä viidessä eri suhteessa: 1:10, 1:30, 1:60, 1:90 ja 1:1000. Nämä laimennossarjoja tehtiin kaksi kappaletta, joista ensimmäisessä oli tavoitteena *E. coli* -pitoisuus $1,8 \times 10^7$ pmy/ml ja toisessa pitoisuus $1,8 \times 10^6$ pmy/ml. Luminometrillä antamissa tuloksissa ympätyille rejektivesisarjoille oli suurta hajontaa. Mutta tuloksista erottuivat edukseen rejektivesilaimennokset 1:30 ja 1:60, jotka antoivat oikean suuntaisia tuloksia (vrt. *E. coli* -sarjasta saadut tulokset). Laimennos 1:10 osoittautui tulosten perusteella liian väkeväksi rejektivesilaimennokseksi. Tulosten arvioinnissa tuli ottaa huomioon se, että useimmat luminometrillä ilmoittamat tulokset olivat yli MicroSnap Coliform & *E. coli* -menetelmäohjeessa (2014) ilmoitetun maksimirajan (300 RLU). Tällöin se vähensi tulosten herkkyyttä.

Kolmannessa kokeessa tavoiteltiin oikeaa herkkyysrajaa luminometrillä saataville tuloksille. Rejektivettä laimennettiin tällä kertaa hanavedellä, kahdessa eri suhteessa: 1:30 ja 1:90. Kolmanneksi näytteeksi sarjaan lisättiin pelkkää hanavettä sisältänyt näyte. Sarjoja oli jälleen kaksi kappaletta,

joista ensimmäisessä oli tavoitteena *E. coli* -pitoisuus $4,9 \times 10^3$ pmy/ml ja toisessa pitoisuus $4,9 \times 10^2$ pmy/ml. Tällä kertaa väkevimmät rejektivesilaimennokset antoivat luminometrillä suurempia tuloksia kuin pelkkää vettä sisältänyt näyte, mikä oli ristiriidassa toisen kokeen tulosten kanssa. Toisaalta kolmannen kokeen tuloksissa pysyttiin lähes määritysrajojen puitteissa. Jos toisessa kokeessa olisi pysytty määritysrajojen sisäpuolella, olisivatko tulokset olleet silloin samansuuntaisia kolmannen kokeen tulosten kanssa?

Rejektivesisarjan tavoitellulta pitoisuudeltaan $4,9 \times 10^3$ pmy/ml puhdas vesinäyte antoi tavoitellun tuloksen mutta toisesta rejektivesisarjasta tavoitellulta pitoisuudeltaan $4,9 \times 10^2$ pmy/ml taas rejektivesilaimennos 1:30 antoi tavoitellun tuloksen. On mahdollista, että mitä enemmän rejektivettä alkuperäinen näyte sisälsi, niin sitä paremmin ympäristössä ollut *E. coli* pystyi lisääntymään siinä ja toisaalta mitä vähemmän *E. coli*a pelkkää vettä sisältävässä putkessa oli, niin sitä heikommin se pääsi lisääntymään rikastuksen aikana. Tavoitellulta pitoisuudeltaan $4,9 \times 10^3$ pmy/ml vesinäytteestä tehtiin maljaviljelyt, joiden tulokset vastasivat tavoiteltua tulosta, mistä voitiin päätellä, että ympäristö oli kokeen aikana kuitenkin onnistunut.

Ensimmäisen ja toisen kokeen tulosten perusteella olisi voinut olettaa yksiselitteisesti, että rejektiveden sameus on se tekijä, joka haittaa EnSURE-luminometrin ja MicroSnap-testin toimivuutta. Kuitenkin kolmannen kokeen tulosten perusteella pelkkä sameus ei ehkä selitäkään sitä, miksi menetelmä ei toimi odotetulla tai toivotulla tavalla. AOAC Research Institutin MicroSnap *E. coli* -testille myönnetystä sertifikaatista (2016) ilmenee, että menetelmää on testattu myös tässä työssä käytetyllä *E. coli* -kannalla ATCC 8739. Tällöin *E. coli* -kannan tyyppillä ei todennäköisesti ollut vaikutusta kokeiden tuloksiin. Rejektiveden laimentamisessa käytetyn RO-veden ja haveden erojen vaikutuksesta kokeen tuloksiin on vaikea vetää mitään johtopäätöksiä.

E. coli oli toisessa ja kolmannessa kokeessa tulosten perusteella selvästikin kasvanut rejektivedessä eli rejektivesi ei todennäköisesti sisällä mitään *E. coli*n kasvua inhiboivia tekijöitä. Kuitenkin rejektivesi voi sisältää jotakin tai joitakin sellaisia komponentteja, jotka saattavat vaikuttaa testistä saataviin tuloksiin joko sellaisenaan tai aiheuttaen rikastuksen aikana jonkinlaisia haitallisia kemiallisia tai entsymaattisia reaktioita, mikä vaikuttaa luminometrin antamiin tuloksiin mutta ei maljaviljelyihin. Rikastusvaiheen voidaan jopa ajatella tästä syystä olevan menetelmän heikkous. Luminometri ei siis pysty havaitsemaan alkuperäisen näytteen sisältämää mikrobipitoisuutta suoraan vaan mikrobipitoisuutta joudutaan kasvattamaan jopa 10 000–100 000 -kertaiseksi, jotta tämä onnistuisi (ks. luku 6.4, s. 12–14). Tällöin itse rikastusvaiheen olosuhteetkin on oltava vakioitu tarkkaan, jotta virheiden tai tulosten hajonnan määrä pysyy tarpeeksi pieninä.

Yhteenvedona voidaan todeta, että EnSURE-luminometri ja MicroSnap *E. coli* -testi ei tämän opinnäytetyön tulosten perusteella sovellu rejektiveden testaamiseen. Mutta jotta menetelmän toimivuudesta tai toimimattomuudesta päästäisiin täyteen varmuuteen, menetelmälle olisi hyvä tehdä paljon toistoja sisältäviä kokeita, jolloin tuloksia päästään käsittelemään ja arvioimaan tilastollisesti. Tällöin myös esim. kokeiden tekijästä ja inkubointiolosuhteista johtuvien virheiden vaikutusta tuloksiin pystytään minimoimaan. Olisi myös hyvä, jos menetelmälle pääsisi tekemään testi- tai koesarjoja useilla ja aidosti kontaminoituneilla rejektivesinäytteillä.

LÄHTEET

3M (2015). Petrifilm™. Product Instructions 6404/6414/6444. Haettu 26.11.2017 osoitteesta <https://multimedia.3m.com/mws/media/7019510/product-instructions-3m-petrifilm-e-coli-coliform-count-plate.pdf>

3M (2017a). 3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plates. Haettu 19.11.2017 osoitteesta https://www.3m.com/3M/en_US/company-us/all-3m-products/~/ECOLICT-3M-Petrifilm-E-coli-Coliform-Count-Plates?N=5002385+3293785155&rt=rud

3M (2017b). 3M™ Petrifilm™ Select *E. coli*. Haettu 19.11.2017 osoitteesta http://solutions.3m.com/wps/porta/3M/en_EU/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/?PC_Z7_RJH9U5230ODK40IMRSPA7P2O65000000_nid=CT0Z743ZGFbe8SD7TQV1GLgl

3M Food Safety (2010). 3M™ Petrifilm™ Plates & 3M™ Petrifilm™ Plate Reader. Haettu 19.11.2017 osoitteesta http://solutions.3msuomi.fi/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en_EU&cmd=1297172974000&assetId=1273677010138&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile

3M Food Safety (2013). 3M™ Petrifilm™ Plates Reference Guide. Haettu 19.11.2017 osoitteesta <http://multimedia.3m.com/mws/media/9090680/3m-petrifilm-plates-reference-guide.pdf>

Albrecht, J. A. (n.d.). *Escherichia coli* O157:H7. Haettu 16.11.2017 osoitteesta <https://food.unl.edu/documents/Escherichia%20coli%20O157%3AH7.pdf>

AOAC Research Institute (2016). Certification. AOAC Performance Tested. Certificate No. 071302. Haettu 4.12.2017 osoitteesta https://www.hygiena.com/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=538

Christie, T. (2002). Tests suggest *E. coli* spread through air. Haettu 16.11.2017 osoitteesta http://www.about-ecoli.com/ecoli_outbreaks/news/tests-suggest-e-coli-spread-through-air/#.Wg2dQ1Vl-pp

Evira (2011). Mikrobiologisten tulosten laskeminen. Toimintaohje LAB 703/3. Haettu 19.11.2017 osoitteesta https://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/lab_703_v3_mikrobiologisten_tulosten_laskeminen.pdf

Evira (2012). Omavalvontaohje lannoitevalmistealan toimijoille. Toimintaohje 12501/03. Haettu 12.11.2017 osoitteesta https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/lomakkeet-ja-ohjeet/kasvit/lannoitevalmistet/lomakkeet/ohjeet/lava_12501_3_omavalvontaohje.pdf

Evira (2016a). Salmonella. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereja. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/salmonella/>

Evira (2016b). *Escherichia coli* / EHEC (VTEC / STEC) ruokamyrkytysten aiheuttajana. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/escherichia-coli/>

Evira (2016c). Fusarium-homeen valvonta. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <https://www.evira.fi/yhteiset/vierasaineet/tutkimukset-ja-projektit/fusarium-homeen-valvonta/>

Evira (2017). Lannoitevalvonnan info 1/2017. Haettu 23.8.2017 osoitteesta https://www.evira.fi/globalassets/kasvit/viljely-ja-tuotanto/lannoitevalmistet/ajankohtaista/lannoitevalvonnan-infokirje-1_2017.pdf

Food Processing Technology (2017). Hygiena. Hygiena Images. Haettu 3.12.2017 osoitteesta http://www.foodprocessing-technology.com/controllers/quality_control/hygiena/

Hallanvuori, S. & Johansson, T. (2010). *Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat*. Eviran julkaisu 1/2010. Vantaa: Multiprint Oy. Haettu 17.12.2017 osoitteesta <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/17427/Elintarvikkeiden+mikrobiologiset+vaarat.pdf?sequence=1>

Hardy Diagnostics (2017a). Instructions for use - COMPACT DRY™ EC. Haettu 15.11.2017 osoitteesta https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CompactDryEC.html

Hardy Diagnostics (2017b). CompactDry by Hardy Diagnostics. Haettu 19.11.2017 osoitteesta <http://hardydiagnostics.com/compact-dry-by-hardy-diagnostics/>

Hygiena (2014). Directions for Use. MicroSnap – Coliform and *E. coli*. Haettu 19.11.2017 osoitteesta https://www.hygiena.com/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=69

Hygiena (2017). EnSURE. Haettu 3.12.2017 osoitteesta <https://www.hygiena.com/food-and-beverage-products/ensure-food-and-beverage-processors.html>

Hygiena (n.d.a). EnSURE. Haettu 19.11.2017 osoitteesta http://www.net-food.fi/images/stories/files/Hygiena_EnSURE_esite.pdf

Hygiena (n.d.b). MicroSnap – Rapid Microorganism Detection. Haettu 19.11.2017 osoitteesta https://www.hygienia.com/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=111

IDEXX (2017a). Colilert. Haettu 15.11.2017 osoitteesta <https://www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf>

IDEXX (2017b). Colilert. Haettu 18.11.2017 osoitteesta <https://www.idexx.com/water/products/colilert.html>

Ihssen, J., Grasselli, E., Bassin, C., Francois, P., Piffaretti, J. C., Köster, W., Schrenzel, J. & Egli, T. Comparative genomic hybridization and physiological characterization of environmental isolates indicate that significant (eco-)physiological properties are highly conserved in the species *Escherichia coli*. *Microbiology* 153, 2052–2066. Haettu 17.12.2017 osoitteesta <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/153/7/2052.pdf?expires=1513538757&id=id&acc-name=guest&checksum=D6989594DED947852EBBE2B0A952AD86>

Ilmatieteen laitos (n.d.). Teematietoa. Kysymyksiä ja vastauksia. Lämpötila ja kosteus. Haettu 19.12.2017 osoitteesta <http://ilmatieteenlaitos.fi/lampotila-ja-kosteus>

Jalava, K., Kuusi, M., Siitonen, A. & Ruutu, P. (2007). *Toimenpideohje EHEC-tartuntojen ehkäisemiseksi*. Kansanterveyslaitos. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/90747/2007c01.pdf?sequence=1>

Johansson, A. (2007). Pintahygieniatieto hyödyttää prosessien ohjaamisessa. *Kehittyvä Elintarvike* 4/2007. Haettu 6.11.2017 osoitteesta <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/26-pintahygieniatieto-hyodyttaa-prosessien-ohjaamisessa>

Kari, M. & Häkkinen, P. (n.d.). *Maatalouden biomassat biokaasulaitoksessa*. ProAgria. Haettu 22.8.2017 osoitteesta https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/maatalouden_biomassat_biokaasulaitoksessa_opas_s.pdf

Kinnunen, V. & Rintala, J. (2015). Biokaasualan monet mahdollisuudet. Teoksessa M. Kymäläinen & O. Pakarinen (toim.) *Biokaasuteknologia – Raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen*. Hämeenlinna: Hämeen ammattikorkeakoulu, 9–20. Haettu 22.8.2017 osoitteesta https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/104180/HAMK_Biokaasun_tuotanto_2015_ekirja.pdf?sequence=1

Kymäläinen, M. (2015). Anaerobinen hajoaminen ja sen hallinta biokaasu-reaktorissa. Teoksessa M. Kymäläinen & O. Pakarinen (toim.) *Biokaasuteknologia – Raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen*. Hämeenlinna: Hämeen ammattikorkeakoulu, 59–81. Haettu 22.8.2017 osoitteesta https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/104180/HAMK_Biokaasun_tuotanto_2015_ekirja.pdf?sequence=1

Labema (n.d.a). 3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plates (2x25). Haettu 15.11.2017 osoitteesta <https://www.labema.fi/tuote-C6404>

Labema (n.d.b). 3M™ Petrifilm™ Select *E. coli* (2x25). Haettu 15.11.2017 osoitteesta <https://www.labema.fi/tuote-c6434>

Labema (n.d.c). Compact Dry EC, *E. coli* ja koliformit. Haettu 15.11.2017 osoitteesta <https://www.labema.fi/tuote-1000169>

Lannoitevalmistelaki 2006/539. Haettu 12.11.2017 osoitteesta <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2006/20060539#Pidp451045824>

Latvala, M. (2009). *Biokaasun tuotanto suomalaisessa toimintaympäristössä*. Helsinki: Edita Prima Oy. Haettu 22.8.2017 osoitteesta http://www.bionova.fi/sites/default/files/sy_24_2009.pdf

Luostarinen, S. (2013). *Biokaasuteknologiaa maataloilla I. Biokaasulaitoksen hankinta, käyttöönotto ja operointi – käytännön kokemuksia MTT:n maatilakohtaiselta laitokselta*. Jokioinen: MTT Jokioinen. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/481263/mttra-portti113.pdf?sequence=1>

Maa- ja metsätalousministeriö (n.d.). Lannoitevalmisteet. Haettu 12.11.2017 osoitteesta <http://mmm.fi/elaimet-kasvit/lannoitevalmisteet>

Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 24/11. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <http://www.finlex.fi/data/normit/37638-11024fi.pdf>

Marttinen, S., Paavola, T., Ervasti, S., Salo, T., Kapuinen, P., Rintala, J., Vikman, M., Kapanen, A., Torniainen, M., Maunuksela, L., Suominen, K., Sahlström, L. & Herranen, M. (2013). *Biokaasulaitosten lopputuotteet lannoitevalmisteina*. Jokioinen: MTT Jokioinen. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti82.pdf>

Motiva Oy. (2013). *Biokaasun tuotanto maatilalla*. Haettu 23.8.2017 osoitteesta https://www.motiva.fi/files/6958/Biokaasun_tuotanto_maa-tilalla.pdf

Net-Foodlab Oy (n.d.a). Hygiena-luminometrit. Haettu 19.11.2017 osoitteesta <http://www.netfood.fi/hygiena-tuotteet/hygiena-luminometrit>

Net-Foodlab Oy (n.d.b) ATP-mittaus eli luminometria. Haettu 19.11.2017 osoitteesta <http://www.netfood.fi/atp-mittaus-eli-luminometria>

Net-Foodlab Oy (n.d.c). Hygiena Microsnap ATP. Haettu 19.11.2017 osoitteesta http://www.netfood.fi/images/stories/files/Hygiena_Microsnap.pdf

Nurmela, T. (2016). Pikamenetelmistä apua teollisuuden tiukkaan työtahtiin. *Kehittyvä Elintarvike* 3/2006. Haettu 6.11.2017 osoitteesta <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/22-pikamenetelmista-apua-teollisuuden-tiukkaan-tyotahtiin>

Oram, B. (2014). *E. coli* in water. Why fecal coliform testing is important - *E. coli*? Haettu 16.11.2017 osoitteesta <http://www.water-research.net/index.php/e-coli-in-water>

Paavola, T. & Kapuinen, P. (2015). Mädätysjäännöksen käsittely ja hyödyntäminen. Teoksessa M. Kymäläinen & O. Pakarinen (toim.) *Biokaasuteknologia – Raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen*. Hämeenlinna: Hämeen ammattikorkeakoulu, 94–123. Haettu 22.8.2017 osoitteesta https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/104180/HAMK_Biokaasun_tuotanto_2015_ekirja.pdf?sequence=1

Pitkänen, T., Kalso, S., Vepsäläinen, A., Rapala, J. & Niemelä, S. I. (2009). *Colilert-menetelmän verifiointi sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 461/2000 mukaisiin koliformisten bakteerien ja Escherichia coli -bakteerin tutkimuksiin Suomessa*. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. Haettu 15.11.2017 osoitteesta https://www.valvira.fi/documents/14444/50159/Rap017_2009_lopullinen.pdf

Solomon, E. B., Yaron, S. & Matthews, K. R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 1/2002, 397–400. Haettu 17.12.2017 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126537/pdf/0612.pdf>

Sosiaali- ja terveysministeriö (2003). *Asumisterveysohje – Asuntojen ja muiden oleskelutilojen fysikaaliset, kemialliset ja mikrobiologiset tekijät*. Helsinki: Edita Prima Oy. Haettu 15.11.2017 osoitteesta <https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/111050/Opp200301.pdf?sequence=1>

St1 (2017). Tuoteseloste 5.1.2017. Hämeenlinna. Julkaisematon lähde.

Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., De-Silva, U. & Gilliland, S. E. (2009). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves by house flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Food Protection* 72, 1547–1552. Haettu 17.12.2017 osoitteesta <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-72.7.1547?code=fopr-site>

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (2015). EHEC. Haettu 23.8.2017 osoitteesta <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/ehec>

Valvira (2016). Talousvesiasetuksen soveltamisohje. Osa III – Enimmäisarvojen perusteet. Haettu 15.11.2017 osoitteesta https://www.valvira.fi/documents/14444/261239/Talousvesiasetuksen_soveltamisohje_osa_III.pdf/81b18002-f37d-4be1-9ac7-f1d10fb43fc6

van Elsas, J., Semenov, A. V., Costa, R. & Trevors, J. T. (2010). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal* 5/2011, 173–183. Haettu 3.11.2017 osoitteesta <https://www.nature.com/ismej/journal/v5/n2/pdf/ismej201080a.pdf>

Wathes, C. M., Howard, K., & Webster, A. J. (1986). The survival of *Escherichia coli* in an aerosol at air temperatures of 15 and 30 °C and a range of humidities. *The Journal of Hygiene* 97(3), 489–496. Haettu 16.11.2017 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2082889/pdf/jhyg00003-0095.pdf>

WHO (2017). Media center. Fact sheets. *E. coli*. Haettu 15.11.2017 osoitteesta <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>

1. KOKEEN TULOKSET LUMINOMETRILLE

<i>E. coli</i> -sarjan laimennos	<i>E. coli</i> -sarja, näyte (RLU)	<i>E. coli</i> -sarja, rinnakkaisnäyte (RLU)	RLU:ta vastaava <i>E. coli</i> -pitoisuus (pmy/ml)
0	-	-	-
-1	-	-	-
-2	-	-	-
-3	-	-	-
-4	958	989	> 10 000
-5	65	28	200 - 5 000
-6	11	12	50 - 200
-7	9	11	50 - 100
-8	-	-	-
			laimennoksen 0 <i>E. coli</i> -pitoisuus > 50 000 000 pmy/ml

<i>E. coli</i> -sarjan laimennos	<i>E. coli</i> -sarja, näyte (Petrifilm SEC, pmy)	<i>E. coli</i> -sarja, rinnakkaisnäyte (Petrifilm SEC, pmy)
0	-	-
-1	-	-
-2	-	-
-3	-	-
-4	-	-
-5	560	540
-6	66	105
-7	5	14
-8	2	2
laimennoksen 0 <i>E. coli</i> -pitoisuus 87 387 387 pmy/ml		

Laimentamaton rejektivesi	Tavoiteltu <i>E. coli</i> -pitoisuus (pmy/ml)	Luminometrin antama tulos (RLU)	Petrifilm SEC (pmy)
Näyte 1	1 000 000	0	0
Näyte 2	10 000	0	0
Näyte 3	1 000	1	0
Näyte 4	100	1	0

HUOMIOITAVIA ASIOITA NÄYTTEENOTOSSA

- Näytteenoton aikana tulee näytteenottajalla olla asianmukaiset suojavarusteet (kypärä, turvakengät, suojalasit, huomioliivi).
- Näytteenotossa tulee käyttää kertakäyttöisiä suojakäsineitä, jotka vaihdetaan aina tarvittaessa uusiin. Käsineitä ei voi vaihtaa liian usein.
- Näytteenotossa tulee toimia aseptisesti.

- Ennen nestenäytteiden ottamista, hanan suuaukolle ja sisäpuolelle suihkutetaan 70 % etanolia. Tämän jälkeen näytettä valutetaan jäteastiaan muutama litra ennen varsinaisen näytteen ottamista. Nestevirtaa ei mielellään katkaista kesken vaan näytteenottoastia laitetään virtauksen tai valutuksen aikana nestevirran alle.
- Nestenäytteet otetaan steriileihin muoviasioihin. Huomioi, että nestenäyte voi olla kuumaa. Käytä tarvittaessa lämpöhanskoja.

- Pintasivelynäytteitä otetaan steriileillä, kertakäyttöisillä välineillä. Samalla välineellä otetaan näyte vain yhdestä paikasta.
- Jos pintasivelynäytteiden ottamiseen käytetään kuivia näytteenotto-puikkoja, puikko tulee kostuttaa ennen näytteenottoa steriiliin, puh- taaseen veteen. Huomioi, ettei vesi likaannu! Vettä kannattaa varata useampi pieni pullo näytteenoton ajaksi.
- Näytteenottohanojen sisäpuolelta pintasivelynäytteet otetaan ennen nestenäytteiden ottamista. Pintasivelynäytteen voi ottaa samasta kohteesta myös nestenäytteen ottamisen jälkeen.
- Pintasivelynäytteitä kannattaa ottaa ennen rejektiveden kuormausta sekä kuormauksen jälkeen samoista pisteistä.
- Pintasivelynäytteet pyritään ottamaan aina samalla tavalla ja samalla tekniikalla.

- Kaikki näytteet toimitetaan kylmäsäilytyksessä (esim. kylmälaukku) mahdollisimman nopeasti analysoitaviksi. Pintaanäytteille analyysit tehdään mielellään 12 tunnin sisällä näytteenotosta ja nestenäytteille viimeistään 3 vuorokauden kuluessa näytteenotosta. Mitä tuoreem- pana näyte saadaan analysoitua, sitä luotettavammat tulokset saa- daan!
- Näytteitä ei pakasteta, ellei se ole täysin välttämätöntä. Pakastami- nen voi vaikuttaa tuloksiin.

NÄYTTEENOTTOSUUNNITELMA REJEKTIVEDEN OLLESSA KONTAMINOITUNUT

- Jos varastosäiliöiden näytteenottohanasta otettu rejektivesi on kontaminoitunut, kontaminaatioaluetta ja -reittiä lähdetään rajaamaan ottamalla ensimmäiseksi neste- ja pintasivelynäytteitä MVR:ltä lähtevästä linjasta.
- Jos MVR:ltä lähtevästä linjasta otetut näytteet eivät ole puhtaita, lähdetään kontaminaation alkuperää selvittämään ottamalla näytteitä prosessia edeltävistä vaiheista niin pitkälle, kunnes voidaan osoittaa piste, josta kontaminaatio on lähtöisin.
- Jos MVR:ltä lähtevästä linjasta otetut näytteet ovat puhtaita, rejektivesi on kontaminoitunut varastoinnin aikana.
 - Otetaan pintasivelynäytteitä varastosäiliöiden näytteenottohanasta ja sen ympäristöstä.
 - Otetaan pintasivelynäytteitä säiliöiden korvausilmaputkien päältä ja sisältä.
 - Jos mahdollista, otetaan pintasivelynäytteitä autoista, jotka ovat viimeisimmilla kerroilla hakeneet rejektivesikuormia. Otetaan näytteitä erityisesti auton säiliön kuormausaukosta ja sen ympäristöstä sekä auton säiliön korvausilmaputkista ja niiden ympäristöstä.
 - Otetaan runsaasti pintasivelynäytteitä kuormausyksiköstä ja -letkusta ennen nestenäytteiden ottamista.
 - Pintasivelynäytteiden jälkeen huuhdellaan kuormausyksikkö (ja -letku) runsaalla vedellä ennen nestenäytteiden ottamista, jotta mahdollisesti kontaminoitunut kalusto ei häiritse nestenäytteistä saatavia tuloksia.
 - Otetaan nestenäyte varastokontin näytteenottohanasta ja kuormausyksikön hanan kautta.
 - Jos näytteet ovat kontaminoituneita, tulee kontaminaatioreitti selvittää pintanäytteiden tulosten perusteella.